生物学研究概说

酶活性的控制

〔英〕P. 科恩 著

科学出版社

58.35
410

·生物学研究概说·

酶活性的控制

〔英〕 P. 科恩 著

罗兰 译

金有豫 校

中国科学院植物研究所北京植物园图书室藏
912466

科学出版社

1982

中科院植物所图书馆
S0013823

内 容 简 介

本书是J.M.阿什沃恩主编的《生物学研究概说》丛书之一。书中引用原核生物和真核生物的各种例子来说明酶活性控制的基本原理。主要阐述细菌的生物合成途径的调节、酶激活作用、血凝机理、补体系统、糖原代谢的调节、激素作用的分子基础和酶活性的共价修饰调节等等。可供生物化学、生理学等领域的科技工作者、大专院校有关专业师生和研究生参考。

P. Cohen
Outline Studies in Biology
CONTROL OF ENZYME ACTIVITY
Chapman and Hall 1976

·生物学研究概说·
酶活性的控制
〔英〕P. 科恩 著
罗 兰 译
金有豫 校
责任编辑 赵甘泉
科学出版社 出版
北京朝阳门内大街137号
中国科学院印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
*
1982年11月第 一 版 开本：787×1092 1/16
1982年11月第一次印刷 印张：3 1/2
印数：0001—5,700 字数：78,000
统一书号：13031·2039
本社书号：2786·13—10
定价：0.58 元

目　录

第一章　绪言……………………………………………………………1

第二章　终产物的抑制作用对细菌氨基酸和核苷酸生物合成的调节………………………………………………3

第三章　限制性蛋白水解对生物学功能的起始作用………25

第四章　糖原代谢的调节及激素作用的分子学基础………48

第五章　限制性蛋白水解或磷酸化作用以外的共价修饰对酶活性的控制……………………………………84

第六章　变构转变的性质…………………………………… 102

第一章 绪 言

“研究细胞或组织中酶活性调节的主要目标，就是阐明代谢与机能相联系的机理”[1]。

悬挂在生物化学实验室墙上的那些代谢图表，给人们留下一个在活细胞中所发生的酶促反应数目非常之多的印象。这些图表还提示了一个很重要的问题，即有机体如何利用各种途径，将代谢物以适当的量、适当的时间、消耗最小的能量而递送到适当的地方。现在已经清楚，对代谢的关键地方，赋与某些具有特殊性质的酶，是完成这种调节的主要方式。

很显然，形成代谢途径最终产物的速度，只能通过改变代谢途径中限速酶的活性来控制。这可以通过增加和减少酶分子数量（诱导和阻遏），或是改变原先存在的酶分子的活性来达到。本书仅讨论后一种作用方式。

研究酶调节的主要目标有两个：

（a）鉴定在代谢途径中将反应速度限制于某一特定代谢活性状态的酶。

（b）确定调节体内限速酶活性的机理，并搞清这种控制如何与细胞整合代谢相关联。

本书主要讨论的是上述目标的第二项内容。这套丛书的另一册，将更详细地论述鉴定限速步骤所用的方法[2]。

就本论题的实质而言，酶活性控制的内容，应包括在整个生物化学中。因此必须先有一个前提，即本书的读者对各种代谢途径及它们相互间是什么关系，有广泛的了解，并且

对蛋白质化学和酶动力学的基本概念，也有所了解。

本书讨论这个论题所采用的酶系统，是从广泛的生物系统中挑选出来的。试图在一定的深度来讨论这些问题，同时也对一些近代所用的研究技术的限度及今后继续进行研究可能采用的方法作了简述。读者可能从第一次阅读中感到最突出的特点是，有机体选择用以控制酶活性的机理是各式各样的。还好随着书中内容的进展，将会展现一些更为总括性的论题，并在每章末尾作一些简短摘要，以使读者对该问题的现状有一个总括的轮廓。

参 考 文 献

〔1〕 Helmreich, E. and Cori, C.F. (1966), *Adv. Enz. Reg.*, 3, 91-107,

〔2〕 Denton, R. and Pogson, C.I. (1976), *Metabolic Regulation*, Chapman and Hall, London.

第二章　终产物的抑制作用对细菌氨基酸和核苷酸生物合成的调节

象大肠杆菌这样的细菌，只给含有碳、氢、氮、氧和硫的最低生长条件的培养基，就能合成多种多样的代谢物，其中包括制造蛋白质所需要的全部20种氨基酸及用于合成RNA和 DNA 的各种核苷酸。相反，高等生物（如哺乳动物）缺乏很多种催化这些反应的酶，而这些化合物却常是人们饮食中的必需营养物。人们认为，由于需要消耗大量的碳、氮和能量去合成氨基酸、核苷酸以及这些生物合成反应所需的全部酶（仅氨基酸的生物合成就有 100 多种），细菌的这种极端多样性，起到了平衡的作用。所以毫不奇怪，当五十年代中期基本弄清有关代谢途径后，人们就把注意力集中到这些反应究竟是如何调节而得以能最有效地应用可利用的营养物方面。确实，用以阐明这些代谢途径的一系列的同位素和突变种的研究，本身就提供了关于这些调节究竟是怎样产生的最初的一些线索。

在这样的一组实验中[1]，将在葡萄糖-盐培养基中指数生长的大肠杆菌培养物离心，再悬浮于同样的培养基中，不过用放射性^{14}C-葡萄糖代替培养基中未标记的葡萄糖。然后继续保温培育一小时，在这段时间里细菌的数量大约增加了一倍。在对数生长的情况下，细菌活跃地合成蛋白质，并含有整套合成每种氨基酸的酶。这时如果分析一下细菌蛋白质，那么正如所料，每种氨基酸结合的放射性约等于总细菌蛋白质的相对含量。然而，如果再改用非标记的氨基酸（例如用

L-异亮氨酸）去补充培养基， 那么掺入蛋白质异亮氨酸残基的放射性将下降95%以上，用其它氨基酸实验，也得到类似的结果。这个实验表明，加入的氨基酸被优先利用了，还说明，加入的氨基酸以某种方式抑制了蛋白质从前体分子的合成。

2.1 L-异亮氨酸生物合成的控制

图2.1列出了 L-异亮氨酸的代谢途径，列举了在结构上与 L-异亮氨酸有关的氨基酸——L-缬氨酸的合成路线。上面介绍的实验表明，在生长培养基中有 L-异亮氨酸存在时，阻止了细胞内 L-异亮氨酸的形成。而且如果将异亮氨酸加到不能独自制造 L-苏氨酸的细菌突变种的培养基中，就会减少为达到最适生长速度所需要的 L-苏氨酸的量[3]。这表明L-异亮氨酸的生物合成，不仅需要 L-苏氨酸，而且 L-异亮氨酸还以某种方式降低了一种或多种可将 L-苏氨酸转化为 L-异亮氨酸的酶活力。因为在这个顺序中被苏氨酸脱氨酶催化的第一步是不可逆的（图2.1），所以 L-异亮氨酸不

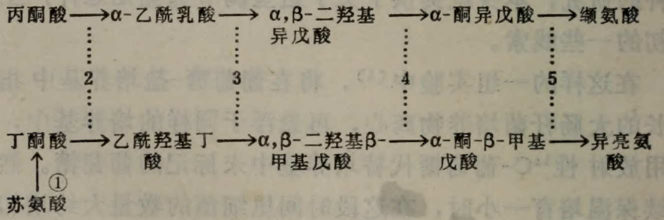


图2.1　形成 L-异亮氨酸和 L-缬氨酸的生物合成途径。酶：1——苏氨酸脱氨酶；2——乙酰羟酸合成酶；3——乙酰羟酸异构体还原酶；4——二羟酸脱水酶；5——转氨酶B以及只催化缬氨酸代谢途径的缬氨酸-丙氨酸氨基丁酸转氨酶[2]。

可能使代谢途径逆转，而发生从 L-异亮氨酸再返回到 L-苏氨酸的作用。

在体外 L-异亮氨酸可抑制苏氨酸脱氨酶[4]，这一发现是搞清酶控制机理的一个重要标志。这个抑制作用是非常专一的，如 L-亮氨酸的抑制作用比L-异亮氨酸要小100倍，而L-缬氨酸和 D-异亮氨酸则什么抑制作用都没有。此外，在体外代谢途径中的其它酶，都不被 L-异亮氨酸抑制。人们不必过多地化费精力，就能立即提出一个非常简明但又有吸引力的、用以解释 L-异亮氨酸和其它氨基酸是怎样调节它们自身生物合成的作用机理。如果这种机理发生在完整细胞中，那么增加 L-异亮氨酸的浓度，会抑制代谢途径中的第一个酶——苏氨酸脱氨酶，而且由于阻遏了整个代谢途径的代谢流程，就减少了新的L-异亮氨酸的生物合成。反过来，如果 L-异亮氨酸的水平下降了，那么因为作用完全是可逆的，它从L-苏氨酸产生的量将自动地增加。

人们发现，L-异亮氨酸对苏氨酸脱氨酶的抑制是竞争性的，在这方面为了达到半最大激活作用，必须增加 L-苏氨酸的浓度，不过这个作用的动力学是复杂的。如果以 L-苏氨酸脱氨作用的初速度对没有 L-异亮氨酸存在时的 L-苏氨酸浓度作图，得到的是一条S形的曲线，而不是一个简单的双曲线函数[5]。如果再以L-苏氨酸脱氨作用对在固定L-苏氨酸浓度时的L-异亮氨酸浓度作图，也得到类似的结果（图2.2）。在明显的抑制作用发生前，L-异亮氨酸必须增加到某一阈限水平以上。这种异常的动力学行为是怎样产生的，将在第六章中加以讨论，但在这里已充分地注意到，曲线的形状显示出酶活性对终产物的抑制作用更加敏感，并已超过了那种如果酶只显示出简单的米-曼氏动力学抑制作用所应有的 L-异亮氨酸的特殊范围。这就提出，在体外观察到的

苏氨酸脱氨酶复杂的动力学，可能有生理学上的重要性，这

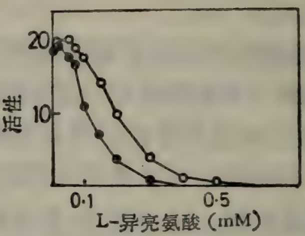


图2.2　大肠杆菌K12的粗提取物中，L-异亮氨酸对L-苏氨酸脱氨酶活性的影响。测定中 L-苏氨酸的浓度为0.02*M*（●）或0.04*M*（○）[5]。

种反应动力学使得代谢途径中 L-苏氨酸和 L-异亮氨酸浓度波动的调节更加敏感。

2.2　苏氨酸脱氨酶对L-异亮氨酸的脱敏作用；变构理论

把苏氨酸脱氨酶加热后，虽然在没有 L-异亮氨酸时所测得的活力仍是一样的，但已失去了它对 L-异亮氨酸抑制的敏感性（图2.3）。苏氨酸脱氨酶这种脱敏作用是一个重要的发现，因为它暗示着 L-异亮氨酸和 L-苏氨酸必定是与酶的不同部位结合的。因此 L-异亮氨酸可能只是间接地影响了 L-苏氨酸与酶的结合。

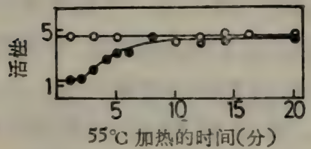


图2.3　加热而致的苏氨酸脱氨酶的脱敏作用。酶的活性是在有（●）或没有（○）0.01*M* L-异亮氨酸时，用 0.02*M* L-苏氨酸测定的。

在经典的综述中，Monod、Changeux和Jacob[6]描述的苏氨酸脱氨酶及其它酶受到代谢性控制这个熟知的特点时，引

用了变构效应物这个术语来描述象 L-异亮氨酸这样的调节分子，它能抑制或激活某一种酶。下面这一段是从他们文章中摘录的一节，它精辟地论述了变构效应物的完整概念。"变构效应物能与变构部位发生专一性地和可逆性地结合。酶变构效应物复合物的形成，并不激活涉及效应物本身的反应，但据认为可以引起蛋白质分子结构断然不同的可逆的交变作用，即变构转变，这种交变作用改变了活性部位的性质，从而改变了一种或几种蛋白质生物活性所特有的动力学参数。在此描述中暗示的一个最基本的然而否定的假定是由于变构效应物的结合部位完全不同于活性部位，并且由于它不参与任一阶段的蛋白质激活反应，所以变构效应物不要求与任何一种底物本身有什么特殊的化学上的或代谢上的关系。因此任何变构效应的专一性和它的实际表现，只是由于蛋白质分子本身的特殊结构所造成的，从而使得它经历由变构效应物的结合而触发的独特的可逆的构象变化。底物与变构效应物之间这种没有任何固有的专一性的化学类似性或反应性要求，似乎是生物学上极为重要的事实。"

2.3 体内L-苏氨酸脱氨酶活性的调节

根据体外观察的 L-异亮氨酸对 L-苏氨酸脱氨酶的专一性抑制作用，可以提出但不能证明，当把 L-异亮氨酸加入培养基后，它是怎样进一步阻止 L-异亮氨酸生物合成的。在体内这种作用的重要性最令人信服的证据，是来自对细菌突变种行为的研究，这种突变种的行为是可以合成一种改变了的苏氨酸脱氨酶，它对 L-异亮氨酸的抑制作用失去敏感性。以致这些细菌产生过量的 L-异亮氨酸，这种氨基酸可大量地排到培养基中[7]。

虽然 L-缬氨酸不抑制苏氨酸脱氨酶，但后来证明，在L-苏氨酸浓度低时，由于苏氨酸脱氨酶活力失去了与 L-苏氨酸浓度的S形曲线的关系，所以 L-缬氨酸也可以激活苏氨酸脱氨酶[7,8]（图2.4）。图2.1有关部分可以说明这种效应的可能作用。在 L-异亮氨酸和 L-缬氨酸生物合成途径中共同涉及到的三种酶，其相互关系是非常密切的。因此，在L-苏氨酸浓度受到限制的情况下，通过 L-缬氨酸的激活作用，会增加 L-异亮氨酸的合成，从而有助于平衡 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸的生物合成。然而在体内是否有这样的平行途径的刺激作用，尚未得到证实。

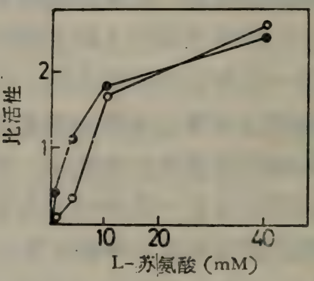


图2.4 存在（●）或不存在（○）5.0mML-缬氨酸时，以苏氨酸脱氨酶的活性对苏氨酸的浓度所作的图[8]。

2.4 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和L-异亮氨酸生物合成的控制

一看图2.5就知道，从 L-苏氨酸生物合成L-异亮氨酸的途径，相对来讲是简单的。虽然直到现在人们仍把它作为一个独立的代谢通路来考虑，但事实上它只不过是更为广阔的合成途径的一个分支，它终止于 4 种氨基酸——L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸（它们共同的前身为

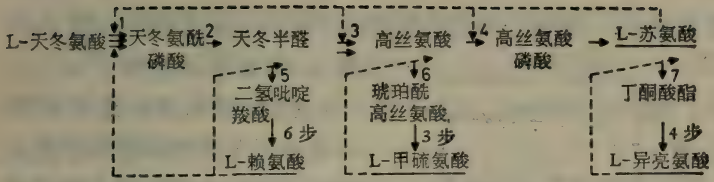


图2.5 从L-天冬氨酸生物合成的 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸。虚线表示终产物的抑制作用。多箭头表示同功酶。1——天冬氨酸激酶；2——天冬半醛脱氢酶；3——高丝氨酸脱氢酶；4——高丝氨酸激酶；5——二氢吡啶羧酸合成酶；6——琥珀酰高丝氨酸合成酶；7——苏氨酸脱氨酶。

L-天冬氨酸）的合成。这种情况就提出了更加复杂的代谢控制的问题。例如，如果途径中最初的一个酶，象天冬氨酸激酶，恰好被 4 种氨基酸的终产物之一有效地抑制了，那么，供给合成其它三种基本代谢物的中间体也将匮乏，这对于细菌就引起了严重的问题。因此，代谢途径的结构本身就启示我们，似乎必需有一个更加合理的控制机理。

2.5 大肠杆菌 K12中不同调节特性的天冬氨酸激酶的同功酶

先前介绍的苏氨酸脱氨酶的一个类似实验揭示出，L-赖氨酸和 L-苏氨酸是仅有的可以明显抑制细菌提取物中天冬氨酸激酶活性的两种氨基酸。然而，无论其中哪一种氨基酸，它们的抑制作用都决不超过40—50%，但是抑制效应是有相加性的，因此当两种氨基酸都过量存在时，抑制作用便几乎是完全的（图 2.6）。用标准蛋白纯化技术把天冬氨酸激酶的活性分成两个组份后，这个难以理解的现象就得到了

解释。第一种组份能被 L-苏氨酸完全抑制，但不受 L-赖氨酸的影响；而第二种组份能被 L-赖氨酸完全抑制，却又不受 L-苏氨酸的影响[9]。

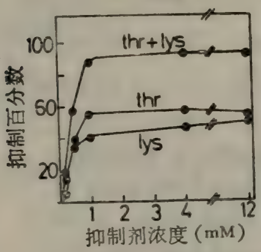


图2.6 L-苏氨酸（thr）和 L-赖氨酸（lys）对大肠杆菌 K12提取物中的天冬氨酸激酶活性的影响[9]。

在 L-赖氨酸过量存在时，可减少天冬氨酰磷酸的产生，但还不致减少到不能生物合成 L-苏氨酸的地步，反之亦然。不过为了使控制有效，无疑地需要以相加性的方法，来保证在 L- 赖氨酸过量存在时，已减少了的天冬氨酰磷酸被导向产生 L-苏氨酸，也保证当 L-苏氨酸过量存在时，减少了的天冬氨酰磷酸被导向产生 L-赖氨酸。这就导致发现，在代谢分支上使之产生 L-赖氨酸的第一个酶——二氢吡啶羧酸合成酶，可专一性地被 L-赖氨酸抑制[10]，而在代谢分支上使之产生 L-苏氨酸的第一个酶——高丝氨酸脱氢酶，可专一性地被 L-苏氨酸抑制[11]。这两种继发性控制，应保证或是 L-赖氨酸或是 L-苏氨酸过量存在时，减少了的天冬氨酰磷酸都可被引向 L-赖氨酸或是L-苏氨酸（图2.5）。

高丝氨酸是 L-甲硫氨酸以及 L-苏氨酸生物合成的中间体（图2.5）。如果仅仅存在高丝氨酸脱氢酶这一种酶的话，当 L-苏氨酸过量时，它可被完全抑制，L-甲硫氨酸也应该被完全抑制，除非另有其它的控制机制。这就使以后发现，大肠杆菌 K12还存在着第三种天冬氨酸激酶及第二种高丝氨酸脱氢酶。这两种酶活性都不会被 L-赖氨酸、L-苏氨酸或 L-甲硫氨酸抑制，尽管它们的合成可受到 L-甲硫氨酸的强力阻遏。诚然，这就需要在限制 L-甲硫氨酸的条件下进行

研究，这种限制 L-甲硫氨酸的条件，可以用一些突变种获得，此突变种在上述两种酶活性被抑制到很容易测定出来之前，本身不能生成 L-甲硫氨酸[12]。当L-赖氨酸和 L-苏氨酸过量存在时，这两种酶活性就可以使 L- 甲硫氨酸的生物合成继续进行。

因而既然存在两种高丝氨酸脱氢酶，就意味着还需要另外一种作用机理，来保证在 L-苏氨酸过量时，减少了的高丝氨酸被导向产生 L-甲硫氨酸，而不产生 L-苏氨酸，反之亦然。通过L-苏氨酸对高丝氨酸激酶的抑制作用[13]，及通过 L-甲硫氨酸对O-琥珀酰高丝氨酸合成酶的抑制作用[14]，就可以达到这一点，这些都在体外得到证实。

在体内的这些控制作用中，其中一部分控制作用（不是全部）的重要性，已通过利用细菌突变种，采用类似前面曾介绍的对苏氨酸脱氨酶所用的方法(见2.3节）得到了证实。

大肠杆菌以共同的前体 DAHP 生物合成三种芳族氨基酸，似乎都是通过极类似的方式调节的（图 2.7）。有三种

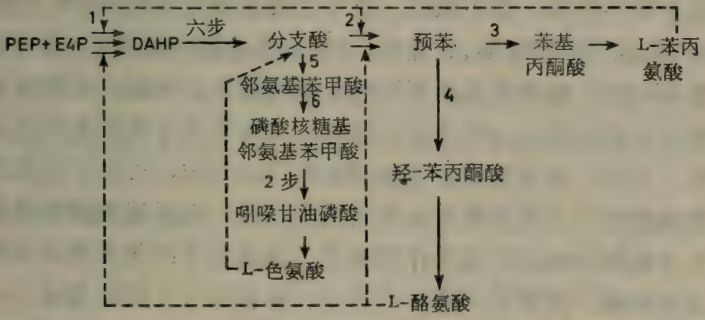


图2.7 芳族氨基酸的生物合成。虚线表示终产物的抑制作用。多箭头表示同功酶。 1——3,脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸（DAHP）合成酶；2——分支酸变位酶； 3——预苯脱水酶； 4——预苯脱氢酶；5——邻苯氨基苯甲酸合成酶；6——邻苯氨基甲酸-5-磷酸核糖基焦磷酸（PRPP)转磷酸核糖基酶。PEP——磷酸烯醇丙酮酸；E4P——赤藓糖-4-磷酸。

DAHP 合成酶：一种可被L-苯丙氨酸抑制；一种可被 L-酪氨酸抑制；第三种不受反馈抑制，但其合成可被 L-色氨酸抑制[15]。在色氨酸合成途径分支以后的合成顺序中，有两个分支酸变位酶，一个可被 L-苯丙氨酸抑制（分支酸变位酶P），另一个可被L-酪氨酸抑制(分支酸变位酶T)[16]。这些例子表明，用两种或多种酶催化同一生化反应（称作同功酶），是细菌调节分支代谢途径的共同方式。

2.6 双功能性的天冬氨酸激酶-高丝氨酸脱氢酶；多功能性酶和多酶复合体

对能将大量 L-苏氨酸排入生长培养基的细菌突变种进行分析后，出乎意外的发现，对苏氨酸敏感的天冬氨酸激酶和对苏氨酸敏感的高丝氨酸脱氢酶，都对 L-苏氨酸的抑制作用部分和完全失去敏感[11]。单一种的突变性变化，却以同样方式影响了两种酶的活性，这就有力地表明，这两种酶至少是共享有一条多肽链。这个设想由动力学研究作了补充,动力学研究表明,在体外,天冬氨酸激酶的底物 L-天冬氨酸和ATP，能抑制高丝氨酸脱氢酶的活性，而高丝氨酸脱氢酶反应的产物NADP 和高丝氨酸，又抑制天冬氨酸激酶的活性。另外，高丝氨酸脱氢酶的底物 NADPH，可保护对苏氨酸敏感的天冬氨酸激酶免受热变性作用，但对赖氨酸敏感的天冬氨酸激酶的热变性作用则否。通过若干纯化步骤以共纯这两种酶，其最后产物被认为是一种称作天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 的均一蛋白质，这就最终证明：这两种酶含有同样的蛋白质。现已发现，这个分子量为 340,000 道尔顿的蛋白质，是由 4 个相同的亚基以非共价键力结合而成的[17]。所以产生这种同一性的原因，必定是因为两种不同

的催化活性是在同一条多肽链上的缘故。

有一个类似的分析表明，由于 L-甲硫氨酸的增加而遏制了天冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶的活性，这些活性也是在单条的称作天冬氨酸激酶Ⅱ-高丝氨酸脱氢酶Ⅱ的蛋白质上呈现出来的。对赖氨酸敏感的天冬氨酸激酶，可称作天冬氨酸激酶Ⅲ[11]。

当将天冬氨酸激酶Ⅰ-高丝氨酸脱氢酶Ⅰ与胰凝乳蛋白酶保温培育时，天冬氨酸激酶的活性遭到破坏，而高丝氨酸脱氢酶的活性则不受 L-苏氨酸的抑制。已分离得到一个分子量为55,000道尔顿的片段，此片段含有脱敏化的高丝氨酸脱氢酶的活性，用末端基团分析表明，此片段相当于多肽链的 C-末端部分。以后又得到另一个天冬氨酸激酶Ⅰ-高丝氨酸脱氢酶Ⅰ的突变种，这个突变种具有对 L-苏氨酸抑制作用敏感的正常的天冬氨酸激酶活性，但却没有高丝氨酸脱氢酶的活性。后来分离出来这种突变种蛋白质，并表明它的分子量为47,000道尔顿，相当于肽链的N末端部分。这种突变属于“赭石”型突变，未成熟的链端，负有缩短了的多肽链[18,19]。对这些片段的分离和分析证明，这两种酶活性是在单条多肽链的不同区段上（图 2.8）。因为这两个片段仍保留

NH_2-甲硫氨酸-精氨酸　AK　86000　HD 甘氨酸-缬氨酸-COOH　（1）

NH_2-甲硫氨酸-精氨酸　47000AK　（2）

55000　HD　甘氨酸-缬氨酸-COOH　（3）

图2.8　大肠杆菌 K12 的天冬氨酸激酶Ⅰ-高丝氨酸脱氢酶Ⅰ的结构。1——天然酶；2——具有天冬氨酸激酶(AK)活性的“赭石”突变种的N-末端片段；3——具有高丝氨酸脱氢酶(HD)活性的、胰凝乳蛋白酶消化形成的C-末端片段。

了对底物亲和力未发生改变的两种酶活性中的任何一种，所以多肽链必定是折叠成两个明显不同的球形区域，当这两个区域彼此分开时，每一部分仍保留它们自己的独有活性。

目前已经介绍了不少双功能的和多功能的蛋白质，其中两种或多种酶活性处于单条多肽链上。这些酶包括色氨酸生物合成中最初的两个酶（图 2.7），邻氨基苯甲酸合成酶和邻氨基苯甲酸-PRPP-磷酸核糖转移酶[20]，及大肠杆菌的依赖于 DNA的 DNA聚合酶[21]，在真核细胞中的两个例子是脂肪酸合成酶复合物[21,23]和糖原脱支酶[24]。

能取得这些酶进展的一种可能方法是基因的融合。用鼠伤寒杆菌(*S.typhimurium*）通过把组氨酸操纵子的第 2 和第 3 个基因（正常情况为两种单独的蛋白质，即组氨醇脱氢酶和咪唑-乙酰-磷酸-氨基-转移酶编码）相融合的实验来完成这项研究。融合是通过诱导靠近顺反子之间区域的两个连续的、可以除去正常存在于两个基因间的链终止密码子的移码突变来完成的。结果两种酶就被作为一条单条的多肽链而合成，通过保持两种催化活性的重要部分的方式而折叠[25]。

在好几个酶由非共价键相互连结成的多功能性酶或多酶复合体中，各种活性在功能上密切相关，并确实常常催化一系列直接联系的反应。这种情形有两个明显的优点：

（a）使反应顺序局限于细胞的一个特定部位，以致一个反应形成的产物，以较高的浓度（要比如果这种酶被任意分散在整个细胞时的浓度高得多）被反应顺序的下一个酶利用。

（b）由于一个反应的产物能直接被导向下一个酶反应，而不能从复合体表面释放出来，那末以其它方式可能产生的不必要的副反应就会减少到最低限度。芳族氨基酸生物合成中的分支酸变位酶系统（图 2.7），相当细致地说明了

这一点。分支酸变位酶 -P（可被苯丙氨酸抑制）与催化形成苯丙氨酸的预苯脱水酶复合，而分支酸变位酶-T（可被酪氨酸抑制）则与催化形成酪氨酸的预苯脱氢酶复合[16]。这就使人们推测，可能实际上存在着两个预苯库，一个专一性地导向苯丙氨酸，另一个则专一性的导向酪氨酸。

遗憾的是，上述状态更难于理解两种双功能性的天冬氨酸激酶-高丝氨酸脱氢酶的情形，因为这两种酶是反应途径中的第一和第三个酶，彼此并不紧接（图 2.5）。没有证据说明第二个酶——天冬氨酸半醛脱氢酶（看来只有一种类型）是连接这两个双功能酶的[11]。现就天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 而论，如果一个单独的、对 L-苏氨酸抑制敏感的天冬氨酸激酶的基因，为高丝氨酸脱氢酶编码的基因融合了，那么只要有极小的突变性变化，就会引起两个球形区域间的相互作用，形成一个这样的结构，使苏氨酸同等地抑制了高丝氨酸脱氢酶和天冬氨酸激酶。这种情况的价值可能在于具有选择性的优点[18]。这个论证不能用于不受反馈控制的天冬氨酸激酶 II-高丝氨酸脱氢酶 II。然而，在所有双功能酶中，它的两种酶活性一定是以等克分子合成的，所以键合就成为控制两种酶活性合成的一个简单的方式。

2.7 各种细菌的天冬氨酸激酶的调节；控制机理的进化

在大肠杆菌和鼠伤寒杆菌中，天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 是在单条多肽链上。而在其它细菌中，如固氮菌类和假单孢菌属，这两种酶就成为两个独立的、每个都可被 L-苏氨酸抑制的蛋白质。在多粘芽胞杆菌和枯草杆菌中，似乎就单是一种天冬氨酸激酶，它既不受 L-苏氨酸的抑

制，也不受L-赖氨酸的抑制，但 L-苏氨酸和 L-赖氨酸在一起，就可产生一种对酶活性几乎是完全的抑制作用（多价反馈抑制作用）。在红色红螺菌中，似乎只有一种能被 L-苏氨酸完全抑制的天冬氨酸激酶。但是，不存在L-苏氨酸时，L-甲硫氨酸和 L-异亮氨酸也能激活这些酶，而 L-异亮氨酸则能有效地逆转 L-苏氨酸的抑制作用。这种细菌的苏氨酸脱氢酶对 L-异亮氨酸的抑制并不敏感。因为在这种有机体中，L-赖氨酸对天冬氨酸激酶的活性似乎没有影响，所以异亮氨酸/苏氨酸比例的增加，似乎就成为加速生产为 L-赖氨酸和L-甲硫氨酸生物合成所需要的共同中间体的信号[26,27]。

虽然还未能象对大肠杆菌K12系统中那样，对上述的一些细菌中的这些酶作出全面的鉴定，不过有一点是很清楚的，那就是各种不同的细菌可以采用很不相同的方式，来解决特定代谢途径的调节问题。一个极为重要的普遍规律是：尽管各种有机体之间，有机体与另一种有机体之间，而且在哺乳动物中，同一种动物体内的一类细胞与另一类细胞之间，代谢途径的各个步骤是基本相同的，然而对这些途径的调节却可以是截然不同的。天冬氨酸激酶系统例证了令人注意的代谢控制机理发展领域，它无疑会在代谢途径本身进化许久以后，得到进一步的演发。

2.8 大肠杆菌中嘧啶生物合成的控制

UTP（尿苷三磷酸）和CTP（胞苷三磷酸）的生物合成，是有关酶活性控制理论发展中具有重要意义的另一个代谢途径。图 2.9 概括了该代谢途径的各个步骤和主要的变构效应。

图2.10示出涉及代谢途径调节中天冬氨酸转氨甲酰酶

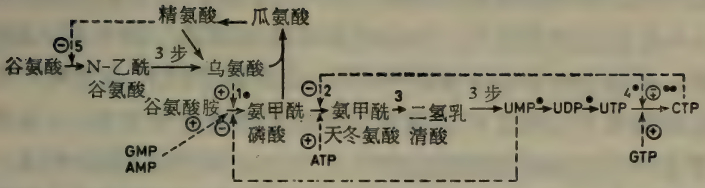


图2.9 大肠杆菌中嘧啶生物合成的调节。（+）变构激活剂；（-）变构抑制剂；·——用 ATP 作底物的反应；1——氨甲酰磷酸合成酶；2——天冬氨酸转氨甲酰酶；3——二氢乳清酸酶；4——CTP合成酶；5——N-乙酰谷氨酸合成酶。CTP 可以是CTP合成酶的激活剂，也可以是它的抑制剂（见正文）。

（ATC 酶）原始研究中的一个实验[28]。在此实验中，采用了缺乏二氢乳清酸酶（反应中紧接着 ATC 酶后面的酶，见图2.9)的大肠杆菌突变种。结果，突变种能催化 ATC 酶的反应，但它的生长仍需要尿嘧啶。就在生长培养基中的尿嘧啶耗尽之前，将突变种培养物分成两部分，一部分供以过量的尿嘧啶。另一部分则由于断绝了尿嘧啶，生长立即停止，并且氨甲酰天冬氨酸开始大量蓄积，四小时内积累的量可高达细菌干重的50%。加入尿嘧啶可迅速减少蓄积的氨甲酰天冬氨酸，而给予过量尿嘧啶的那一部分，在未出现断绝尿嘧啶之前，从不蓄积氨甲酰天冬氨酸。这表明 ATC 酶的活力在体内可受到尿嘧啶或是从

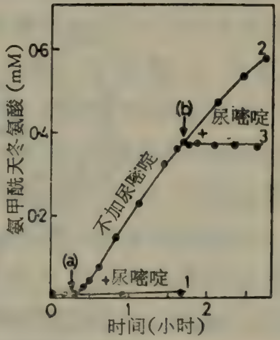


图2.10 尿嘧啶断绝对缺乏二氢乳清酸酶的大肠杆菌突变种中氨甲酰天冬氨酸产生的影响。（a）尿嘧啶耗尽的时刻。就在这一时刻之前，对培养物的一部份（1）供以 0.4 m*M*的尿嘧啶；（b）在此时对另一部份（3）供以0.4 m*M*的尿嘧啶[28]。

它衍生出来的代谢物的抑制，并得以发现，CTP是ATC酶在体外的强反馈抑制剂。CMP的抑制作用较弱，UTP 和 UMP 则几乎完全没有抑制作用[28,29]。已用缺乏CTP 合成酶的突变种证明了体内的 CTP抑制作用的重要性（图 2.9）。这种突变种能按照嘧啶代谢途径制造 UTP，但为了制造 CTP，需要加入外源性胞嘧啶核苷。当不给予胞嘧啶核苷时，细胞内UTP的量可上升10倍，并且尿嘧啶核苷被排到培养基中，这说明，尽管有大量的UTP存在，这种嘧啶的代谢却不受控制。当有胞嘧啶核苷存在时，由于产生了CTP，就不会过量产生UTP了[30,31]。

在体外，ATP是ATC酶的激活剂[28,29]。若以ATC酶的活性作为天冬氨酸的函数作图，便得到一个S形曲线。CTP可以与天冬氨酸相竞争，使S形曲线向右改变，使曲线的S形弯度加大（图2.11）。ATP则可使曲线向左改变，使曲线的S形弯度减小。并且还可拮抗CTP的抑制作用。因为，为了

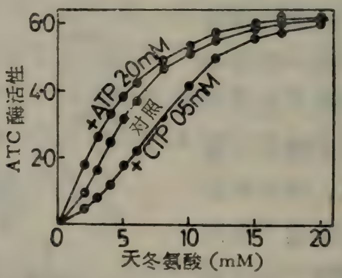


图2.11　ATP和CTP对ATC酶活性的影响。测定是在3.6mM氨甲酰磷酸pH7.0时进行的[28]。

RNA的合成不致受到限制，四种核苷三磷酸，即ATP、GTP、CTP、UTP，必须大致等量存在，所以当L-天冬氨酸的量减少时，激活ATC酶，可能有助于刺激UTP和CTP的合成，从而平衡了嘌呤和嘧啶的生物合成。ATP和CTP对 ATC 酶活

性的影响，与 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸对苏氨酸脱氨酶活性的影响是相似的（图2.2；2.4）。

平衡UTP、CTP、ATP和GTP产生量的另一些机理，可能发生在CTP合成酶的水平上（图2.9）。CTP 合成酶的活性需要有变构激活剂GTP[32]。当CTP浓度高时，CTP可能是通过与底物UTP的竞争而抑制CTP合成酶，但当UTP浓度低时，CTP 则可能是通过代替 GTP 而激活 CTP 合成酶。ATP 也是 CTP合成酶和嘧啶代谢途径另外三种酶的底物（图2.9）。

在ATC酶之前的氨甲酰磷酸合成酶（图 2.9），也受嘌呤和嘧啶核苷酸二者的控制[33,34,35]。它受到UMP以及UDP和UTP的强烈抑制，但却能被嘌呤核苷酸，如IMP（次黄苷酸）、GMP 和AMP所激活。在大肠杆菌中，氨甲酰磷酸的另一个用途，是在 L-精氨酸生物合成途径中从鸟氨酸形成瓜氨酸（图 2.9）。当精氨酸过量时，由于精氨酸发挥了对*N*-乙酰-L-谷氨酸合成酶〔它是导致鸟氨酸产生的途径上的第一个酶（图2.9)〕的专一性抑制作用，鸟氨酸便不能产生[36]。当精氨酸可被生长所利用时，氨甲酰磷酸便只用于嘧啶的生物合成，因此氨甲酰磷酸合成酶(而不是ATC酶)就变为嘧啶途径中的第一个酶。鉴于尿嘧啶核苷酸(在体外，特别是 UMP)的专一性抑制作用，于是提出当精氨酸过量时，嘧啶核苷酸生物合成的初级控制，可能是通过甲酰磷酸合成酶起作用，而不是ATC酶。然而，当精氨酸的量有限时，鸟氨酸浓度便上升。因为鸟氨酸就是氨甲酰磷酸合成酶的变构激活剂，并可以逆转UMP的抑制作用[33,35]，所以在精氨酸受到限制的情况下，嘧啶生物合成的初级控制又恢复到由ATC酶起作用了。这样就引出了一个很有益的代谢调节原理。虽然代谢途径必是受到限速酶的调节，但这限速步骤可能会因细

胞代谢状态而有所不同。

以CTP而不是以UTP作为ATC酶的反馈抑制剂，起初认为似乎有些奇怪，因为如果CTP过量，而尿嘧啶核苷库受到限制，那么ATC酶将被抑制，从而就不能向细胞提供UTP。除非有大致等量的UTP存在，否则CTP不能被结合进RNA，生长就会停止[28]。然而在详细分析了CTP对ATC酶的抑制作用后表明，在体外给以过量的氨甲酰磷酸，CTP的抑制作用就不完全，从不超过85%[28]。因为缺乏UMP和UTP的细菌，应具有高水平的氨甲酰磷酸（氨甲酰磷酸合成酶未被抑制），所以，尽管存在非常过量的CTP，中间产物还是缓慢而连续点滴地产生UTP。目前还没有证据认为存在一个不被CTP抑制而在尿嘧啶核苷库控制下的第二个ATC酶。这个例子清楚地说明为什么定量分析变构效应剂的作用，可以确切地了解体内控制机理是如何起作用的。

2.9 ATC酶的结构；单一的酶可分离为催化亚基和调节亚基

在经典实验中，Gerhart 和 Schachman[37]可将ATC酶（沉降系数是11.7S）分成沉降系数分别为5.8S和2.8S两个较小的亚基。5.8S组分具有催化活性，但不被CTP抑制，2.8S组分无催化活性，但却具有与CTP和ATP相结合的部位。再者，如果把2.8S加到5.8S组分中，5.8S组分就恢复了对CTP抑制作用的敏感性。所以称5.8S组分为催化亚基（C），称2.8S组分为调节亚基（R）。因为活性部位和变构部位实际上是位于不同的多肽链上，这就完全证明了活性部位和变构部位是不同的，从而有力地支持了变构的观点。它意味着，CTP的结合引起结构改变，必定抑制酶的催化作用，这

种改变通过天然酶中连接两个多肽链的亚基接触，从R亚基转到C亚基。有关这个发现的含意，将在第六章中加以讨论。

天然的ATC酶具有R_6C_6结构[38]，亚基的排列如图2.12所示，是按D_3-32对称形排列的[39]。不过需要强调的是，对催化作用来说存在着不同的亚基，并不是普遍规律，事实上相对来讲倒是个罕见的现象。苏氨酸脱氨酶和天冬氨酸激酶Ⅰ-高丝氨酸脱氢酶Ⅰ，各自都是由四个相同的亚基组成，所以在这些酶中，变构部位和活性部位是位于同样的多肽链上。

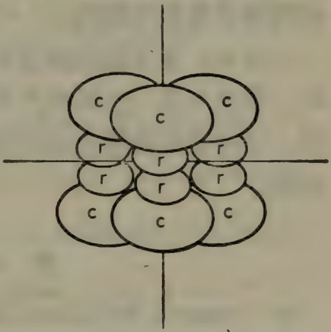


图2.12 ATC酶中亚基的排列。R——调节亚基；C——催化亚基。

2.10 摘　要

（a）终产物对代谢途径中第一个酶的反馈抑制作用，是调节细菌生物合成途径的共同机理。这种调节机理使碳、氮和能的需要量降到最低限度，并保证整个代谢途径对终产物的变化发生反应。Atkinson[40]提出，引起对反应后一步骤进行控制的另一重要原因是，所调节的那一步骤（就是该控制要调节的步骤）前的中间产物的浓度明显地增加了。每一个细胞中存在着数千种聚合电解质和小代谢物，于是提出了溶解度这一重大的问题，并且为了能对反应顺序中那个首先进行的步骤上定点控制，维持低的代谢物浓度可能是一个有力的使人信服的原因。

（b）阐明这些调节机理的两个特别强有力的研究，就是对已分离酶的性质和对特异酶缺陷的细菌突变种的行为所进行的分析。对由体外进行的酶学和蛋白质化学的分析所得出的调节机理（在体内实际上是起作用的）来说，这些突变种的研究是很关键的。

（c）分支途径的存在及各途径之间功能上的相互依赖，需要有另一些对终产物抑制的基本形式进行的附加控制。这些调节机理及这些控制中所涉及的酶结构，是完全不同的。

参 考 文 献

〔1〕Abelson, P.H.(1954), *J.Biol. Chem.*, 206, 335-343.

〔2〕Umbarger, H.E.(1969), *Curr. Tops.Cell.Reg.*, 1,57-76.

〔3〕Umbarger, H. E. (1955), In *Amino Acid Metabolism* 442-451,(Eds)McElroy and Glass, Johns Hopkins Press, Baltimore.

〔4〕Umbarger,H.E.(1956), *Science*, 123, 848-848.

〔5〕Changeux,J.P. (1963). *Cold.Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26, 313-318.

〔6〕Monod, J., Changeux, J.P. and Jacob,F. (1963). *J.Mol. Biol.*, 6, 306-329.

〔7〕Changeux, J.P. (1963),*Cold. Spring. Harb. Symp.Quant. Biol.*, 28, 497-504.

〔8〕Freundlich, M. and Umbarger, H. E. (1963), *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 28, 505-511.

〔9〕Stadtman, E.R.,Cohen,G. N., Le Bras, G.and Robichon-Szulmayster, H.(1961), *J.Biol. Chem.*,236,2033-2038.

〔10〕Yugari, Y.and Gilvary, C.(1962), *Biochem. Biophys. Acta*, 62, 612-614.

〔11〕Cohen,G.N.(1969),*Curr.Tops.Cell. Reg.*, 1, 183-231.

〔12〕Patte, J.C.,Le Bras,G. and Cohen, G.N. (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, 136, 245-257.

〔13〕Wormser, E. H. and Pardee, A.B.(1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, 78, 416-432.

〔14〕Rowbury.R.J.(1962), *Biochem. J.*, 82,,24P.

〔15〕Brown, K.D.and Day,C.H.(1963),*Biochem. Biophys.Acta*,

77, 170–172.
〔16〕 Cotton, R.G.H. and Gibson,F.(1965), *Biochem. Biophys. Acta*, 100, 76–88.
〔17〕 Falcoz-Kelly,F., Janin,J.,Saari, J.C., Veron, M., Truffa-Bachi, P. and Cohen, G. N. (1972), *Eur. J. Biochem.*, 28, 505–519.
〔18〕 Veron,M.and Cohen,G.N.(1974),In *Metabolic Interconversions of Enzymes* 1973, 335–347. Eds. Fischer, E. H., Krebs, E.G., Neurath, H. and Stadtman, E. R., Springer-Verlag, Heidelberg.
〔19〕 Veron, M.and Cohen,G.N.(1972),*Eur.J. Biochem.*, 28, 520–527.
〔20〕 Truffa-Bachi, P.and Cohen, G.N.(1973), *Ann. Rev. Biochem.*, 42,113–134.
〔21〕 Klenow, H.,Overgaard-Hansen, K.and Patkar, S.A.(1971), *Eur.J.Biochem.*,22, 371–381.
〔22〕 Schweizer, E., Holzner,U., Meyer, K. H., Tauro, P.and Schweizer, M. (1974), In *Comparative Biochemistry and Physiology of Transport*, 219–244. (Eds) Bolis, L., Bloch, K.,Luria,S.E.and Lynen,F.,North Holland Publishing Co.
〔23〕 Lornitzo,F.A., Qureshi, A.A.and Porter, J. W. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250,4520–4529.
〔24〕 Taylor, C.,Cox,A.J.,Kernohan,J. C. and Cohen,P. (1975), *Eur.J.Biochem.*, 51, 105–115.
〔25〕 Yourno,J., Kohno,T.and Roth,J.R.(1970),Nature,228,820–824.
〔26〕 Datta,P.and Gest,H.(1964),*Nature*,203, 1259–1261.
〔27〕 Paulus,H.and Gray,E.(1964),*J.Biol.Chem.*,239,4008–4009.
〔28〕 Gerhart,J.C.(1970),*Curr.Tops.Cell.Reg.*, 2,276–325.
〔29〕 Gerhart,J.C.and Pardee, A.B.(1962),*J.Biol.Chem.*, 237,891–896.
〔30〕 Neuhard,J.(1968), *J.Bacteriol.*, 96, 1519–1527.
〔31〕 O'Donovan,G.A.and Neuhard,J.(1970), *Bact. Reviews*, 34, 278–343.
〔32〕 Long,C.W.and Pardee,A.B.(1967),*J.Biol.Chem.*, 242,4705–4721.
〔33〕 Pierard, A.(1966),Science 154, 1572–1573.
〔34〕 Anderson,P.M.and Meister, A.(1966), *Biochemistry*,5,3164–3169.
〔35〕 Ahmed,A.and Ingraham,J.L. (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 4033–4038.

〔36〕 Vyas, S., and Maas, W.K. (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 542-546.

〔37〕 Gerhart, J.C. and Schachman, H.K. (1965), *Biochemistry* 4, 1054-1062.

〔38〕 Rosenbusch, J.P. and Weber, K. (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 1644-1657.

〔39〕 Warren, S.G., Edwards, B.F.P., Evans, D.R., Wiley, D.C. and Lipscomb, W.N. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 1117-1121.

〔40〕 Atkinson, D.E. (1970), *Current Topics in Cellular Regulation*, 1, 29-43.

第三章　限制性蛋白水解对生物学功能的起始作用

3.1　小肠的酶原激活作用

胰酶原的激活作用列为已搞清了它的酶调节概念的第一个系统。早在本世纪初就已经知道，在小肠中，刚分泌出来的胰液，只有当它与肠激酶这个因子接触后，才能够消化蛋白质。随后的进展分两个阶段。在二十世纪三十年代，经改进后的蛋白质分级分离技术，可以使好几种酶与其无活性的前身彼此完全分离开来，从而可以系统地描述激活作用的基本概况[1]。在二十世纪五十年代，由于一些更加成熟的分离技术的问世，以及一些解决蛋白质一级及三级结构方法的发现，这才有可能对伴随着需要起始激活作用的分子细节过程进行分析。

3.1.1　胰蛋白酶及其专一性

激活的胰液含有 7 种不同的蛋白酶（图 3.1）。包括三种类型的肽链内切酶——胰蛋白酶（T），胰凝乳蛋白酶（ChT）A、B、C 和弹性蛋白酶（E)；两种类型的肽链端解酶——羧肽酶 A(CpA)和羧肽酶 B(CpB)。因为这些肽链内切酶具有彼此相互补充的特性，因此，它们的结合作用将使在胃里已被蛋白酶部份水解的食物蛋白质更广泛地碎分。肽链端解酶（CpA和CpB）催化从肽链 C-末端继续释放出氨基酸；CpB 切除由胰蛋白酶作用所产生的肽的 C-末端的精氨

酸和赖氨酸，CpA则切除由胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶消化而产生的肽的C-末端的氨基酸，或者是已被CpB作用过的胰蛋白酶的肽的 C-末端的氨基酸。进一步的消化作用则由从肠细胞分泌到小肠中的各种肽酶去完成。专一性地水解x-脯氨酸二肽的脯氨酸二肽酶特别重要[2]，因为脯氨酸-x和x-脯氨酸键是不易被胰蛋白酶所断开的。另一个就是典型的“亮氨酸氨肽酶”，它能催化从肽链的 N-末端连续释放氨基酸[3a]。

蛋白酶	类型	专一性	被断开的肽键
胰蛋白酶	肽链内切酶	窄	赖氨酸-x 精氨酸-x
胰凝乳蛋白酶A、B、C	肽链内切酶	宽	酪氨酸-x，苯丙氨酸-x，色氨酸-x，亮氨酸-x，组氨酸-x
弹性蛋白酶	肽链内切酶	宽	缬氨酸-x，丙氨酸-x，甘氨酸-x，丝氨酸-x
羧肽酶A	肽链端解酶	很宽	x-酪氨酸，x-苯丙氨酸，x-色氨酸，x-亮氨酸，x-异亮氨酸，x-甲硫氨酸，x-组氨酸，x-丙氨酸，x-缬氨酸，x-苏氨酸
羧肽酶B	肽链端解酶	窄	x-赖氨酸，x-精氨酸

图3.1 胰蛋白酶的专一性。

3.1.2 胰脏酶原的分泌和激活

七种蛋白酶都是被合成为无活性的前体，称为酶原；这七种酶是胰蛋白酶原(Tg)，胰凝乳蛋白酶原(ChTg) A、B、C，弹性蛋白酶原(ProE)以及羧肽蛋白酶原A和B(ProCpA和ProCpB)。它们存在于外分泌性胰脏腺泡细胞的球形酶原颗粒（此颗粒通过膜与其它细胞组分隔开）之中。以胞吐的方式（这是一种与吞噬作用完全相反的过程，在这一过程中，酶原颗粒膜与腺泡细胞外层膜相融合）分泌于十二指肠。分泌可被支配胰脏的迷走神经及肽激素类——肠促胰酶素和肠促胰液肽所刺激。这两种肽激素在小肠上部的肠细胞中合成，分泌到血液循环，再从血液循环移入胰脏。肠促胰酶素刺激分泌少量富含酶前体的胰液，而肠促胰液肽则刺激富含HCO_3^-离子、但含酶原很少的胰液不断地流动。由于胰蛋白酶在最适 pH（接近 8.0）时有一个相当陡的 pH-活性峰，因此，HCO_3^-离子是胃的酸性内容物的重要缓冲剂。最强的肠促胰酶素分泌刺激剂是某些 L-氨基酸和长链脂肪酸，而酸本身就是最有效的肠促胰液肽的刺激剂[4a,4b]。

肠激酶（Ek）是在小肠刷状缘细胞中合成的一种蛋白水解酶。由于 Ek 存在于小肠中，于是通过始动胰蛋白酶原向胰蛋白酶转化[1]而开始了酶原激活的过程（图 3.2）。一些缺乏肠激酶活性的患者可发生严重的肠紊乱，这就证实了 Ek 在体内的重要作用[5]。一但

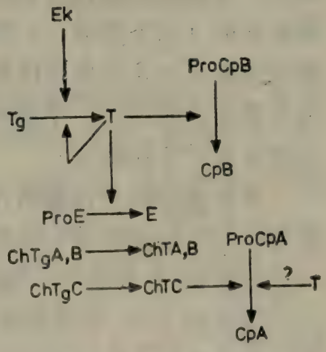


图3.2 胰脏酶原被激活的可能顺序。

始动了，胰蛋白酶原向胰蛋白酶的转化就变成自身催化，因为胰蛋白酶可以催化它自己从胰蛋白酶原的形成（图3.3）。

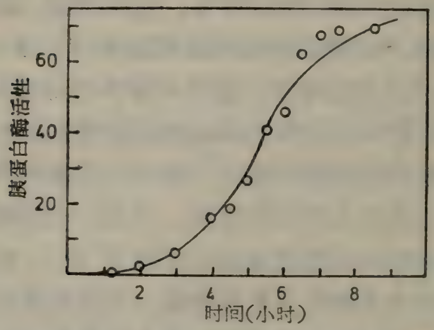


图3.3 胰蛋白酶对胰蛋白酶原的自身催化激活。圆圈（○）为通过实验得到的点，实线为单纯自身催化反应的理论曲线[1]。

胰蛋白酶也可以催化弹性蛋白酶原[3b]、胰凝乳蛋白酶原[1,3c,3d,6]和ProCpB[7,8]的激活。在体内，ProCpA是以与胰凝乳蛋白酶原形成的复合体而存在的。此复合体的激活机理可能是：通过胰蛋白酶而形成胰凝乳蛋白酶C，而后胰凝乳蛋白酶C又激活ProCpA。但是，如果ProCpA-胰凝乳蛋白酶原C复合体解离了，那么胰蛋白酶独自就可以催化ProCpA的激活[9]。

每种酶原只要断开一个肽键就可以被激活（图3.4）。肠激酶断开胰蛋白酶原中敏感的赖氨酸6-缬氨酸7肽键，要比断开等量的胰蛋白酶快2000倍，这可能是因为肠激酶能识别特殊的（天冬氨酸）4-赖氨酸序列[10]。不过胰蛋白酶对胰蛋白酶原的自身催化性激活，可能仍具有生理学意义，因为与胰蛋白酶相比，小肠中只存在微量的肠激酶。肠激酶并不激活其它任何酶原。

虽然通过胰蛋白酶断开精氨酸15-异亮氨酸16的单一键，就可以促发胰凝乳蛋白酶的充分活性，然后另外一些肽键（亮氨酸13-丝氨酸14，酪氨酸146-苏氨酸147和天冬酰胺148-丙氨酸149）为胰凝乳蛋白酶自身催化所断开，但活性却没有任何进一步的改变。两个二肽——丝氨酸-精氨酸和苏

酶　原	激　活　肽
牛Tg	缬-天冬-天冬-天冬-天冬-赖↓异亮氨酸-缬氨酸-
猪Tg	苯丙-脯-苏-天冬-天冬-天冬-天冬-赖↓异亮氨酸-缬氨酸-
牛ChTg-A	半胱-甘-缬-脯-丙-异亮-谷-脯-缬- 亮-丝-甘-亮-丝-精↓异亮-缬-
牛ChTg-B	半胱-甘-缬-脯-丙-异亮-谷-脯-缬- 亮-丝-甘-亮-丙-精↓异亮-缬-
牛ChTg-C	半胱-甘-丙-脯-异亮-苯丙-谷-脯- 天冬酰胺-丝——丙-精↓异亮-缬-
猪Pro-E	………精↓缬-缬-
牛CpB	………精↓苏-苏-
牛CpA	………×↓丙-精↓丝-苏-天冬酰胺- ├———CpA_{α} ‖——CpA_{β}

图3.4　胰脏酶原的激活。以箭头表示激活过程中被断开的肽键[3b,3c,6,7,8,9,11]。

氨酸-天冬酰胺可被释放出来，但胰凝乳蛋白酶A的三条多肽链不会解开，因为它们是由二硫键交联在一起的[30]。

胰凝乳蛋白酶C对 ProCpA 的激活，包括断开一个肽键，从N端失去50～60个氨基酸，以及产生一个称为 CpA_{α} 的形式。胰蛋白酶对 ProCpA 的激活也主要是产生CpA_{α}，但有可察觉量的 CpA_{β}（它少两个氨基酸）存在（图3.4）。从胰凝乳蛋白酶C和胰蛋白酶的不同专一性来看，它们都形

成 CpA_α 是令人惊奇的（图3.1）。然而，对N末端丙氨酸前面那个残基的性质还不了解[9]。尽管 CpB 和 CpA 分子量几乎一样，都是 35,000 道尔顿[11]，但 ProCpB 似乎比 ProCpA 要大些（57,000对41,000 道尔顿）。被胰蛋白酶断开一个精氨酸-苏氨酸键，而分子大小并无明显的减少，但可迅速激发 CpB 的最大的活性，达60～70%。最大活性的激发，随分子减少到35,000道尔顿而变得缓慢，并可能包括另一个肽键的断开[7,8]。有关弹性蛋白酶原、ProCpA 和 ProCpB 的激活肽的结构问题，还未得到解决。

据推测，胰蛋白酶类之所以合成为酶原的形式，主要是防止在蛋白酶被贮入酶原颗粒前降解其它的胰脏蛋白质，以及防止在酶分泌出来之前在酶原颗粒内相互消化。专一性分泌颗粒的用处在于使分泌的控制更容易些，而且也可阻止酶原被在腺泡细胞内颗粒之外的其他蛋白酶所激活。还有另一种蛋白质分泌到胰液中，它是胰蛋白酶的专一性抑制剂[1,12]。在胰液的蛋白质组分中，胰蛋白酶抑制剂只含 2 %，比胰蛋白酶原的浓度要低得多[13]。胰蛋白酶抑制剂的功能可能是为了防止胰蛋白酶原被酶原颗粒中可能存在的一些微量胰蛋白酶自身催化激活，这样就可保证只在胰液与肠激酶相遇时，才发生酶原的激活作用。

胰脏酶原的激活作用，是利用酶调节作为放大初刺激效应手段的一个例子。每个肠激酶分子可使许多胰蛋白酶原分子转变成胰蛋白酶，而每个胰蛋白酶分子又促发产生更多的胰蛋白酶分子；每个胰蛋白酶分子可激活另外一些酶原；而每个被激活了的蛋白酶分子又可水解很多肽键。可在本章的后面部分及第四、五章中看到这种现象的另外一些例子。每个激活部位都位于靠近各蛋白质的氨基末端，并且只须断开一个肽键就可以促发活性，这是生物经济学方面的典型例子。

酶原的天然构型显然能使胰蛋白酶首先断开一个特别的精氨酸-X键或赖氨酸-X键，但是如果酶原处于变性状态，那么这种构型又可防止胰蛋白酶切断很多其它易受影响的敏感的键。

一般并不认为人胰脏每天可分泌约100克水解酶,实际上这比英国人平均每日饮食摄入的蛋白质的量稍高了些[14]。所以，严密控制过程的一方面就在于这些蛋白酶必须易受蛋白水解，以便最终相互降解为可被重吸收的氨基酸组分。

3.1.3 胰凝乳蛋白酶原转化为胰凝乳蛋白酶

应用X射线晶体衍射方法已经解决了胰凝乳蛋白酶和胰凝乳蛋白酶原的三级结构，分辨力可达 2.5 Å[15,16]。胰凝乳蛋白酶中起催化作用的主要残基是丝氨酸195。丝氨酸195是以氢键与组氨酸57相连结，而其后，组氨酸57又以氢键与天冬氨酸102相连接(图3.5)。人们把这一组氢键称做电荷交

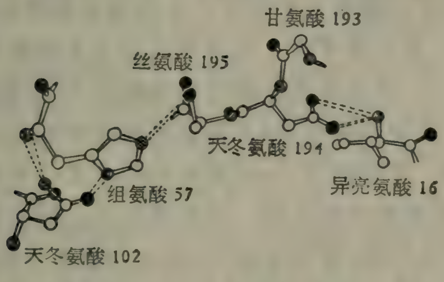


图3.5 胰凝乳蛋白酶活性中心的某些重要氨基酸的构象。从分子的外表向内部看。○——碳原子；◍——氮原子；●——氧原子[3d]。

换系统，其中，负电荷从隐蔽的天冬氨酸 102 残基通过疏水性环境，转移到丝氨酸的氧上。这个氧原子的负电性增加，就使在正常状态下无活性的丝氨酸羟基具有强大的亲核能

力，这种能力可以对所水解的肽键的羰基碳起动亲核性攻击[17a]。当然，在晶体衍射术分析的前几年，就已认识了丝氨酸195的重要性，因为它能与二异丙基氟磷酸（DFP）迅速反应而形成一个完全没有活性的共价衍生物[18]。胰蛋白酶、弹性蛋白酶、甚至肠激酶[10]，也都能被 DFP失活。这种现象的意义将在下面讨论。

胰凝乳蛋白酶原和胰凝乳蛋白酶总的折叠都非常相似，对二者的结构进行了比较之后提出，通过激活作用，链上只发生几点有意义的变动。最感到惊奇的发现是：在酶原和已激活的酶中，丝氨酸195、组氨酸57和天冬氨酸102的位置，实际上没有改变[16]。纵然丝氨酸195与DFP或与氰酸盐的反应要比与激活的酶的反应慢得多[19]，但就这三种酶位置没有变化这一点，与所观察到的丝氨酸 195 在酶原中具有特殊的反应性是一致的。

从酶激活的观点来看，下面这些变化似乎是具有决定性的。被胰蛋白酶断开的键所产生的异亮氨酸16的自由α-氨基（图3.4）塞在分子内，在分子内与天冬氨酸194形成离子对（图3.5），结果异亮氨酸16和缬氨酸 17 的侧链就被掩蔽起来了，并且天冬氨酸194不再象在酶原中那样与组氨酸 40 有氢键连接。甘氨酸193与组氨酸40形成了一个新的氢键。精氨酸145从表面移到内部，在那里它可以和天冬氨酸194的羧基侧链相互作用。甲硫氨酸192则从内部移到酶原中原来为精氨酸 145 所占有的表面位置上。这些变化形成了四个新的专一性决定子（这在酶原中是没有的，而且也是胰凝乳蛋白酶所赖以识别它的多肽底物的九个因素之外的）。曾有人估计，这可能说明为什么胰凝乳蛋白酶的活性要比胰凝乳蛋白酶原大 10^4—10^6 倍[19]。另一方面，这个理论不能解释为什么在酶原中，氰酸盐（它不与专一性的“凹穴”相互作用）使丝

氨酸195氨甲酰化的作用要慢 30—40 倍[19]。或许也发生了细微的"电荷替换系统"的重新组合，但在现行可能的分辨率上仍不能测定出来。

胰凝乳蛋白酶原转变成胰凝乳蛋白酶，很能说明变构转变时可能发生的那种结构的改变（第二章）。在活性中心能自由移动的表面部位上肽键发生断裂（类似于一个变构效应物的结合），这就起始了结构的改变，这一改变可导致形成底物结合凹穴处。就整体结构来说，结构没有显著的变化，这 230 个氨基酸中只有几个位置的氨基酸稍微变化，就足以完成这种转变了。

虽然胰蛋白酶原和胰凝乳蛋白酶原的激活肽彼此并不十分相似（图 3.4），但胰蛋白酶、弹性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶 A 和 B，每一种大约都含有 230 个氨基酸，而且都可被 DFP 专一性地抑制。胰凝乳蛋白酶 A 与 B 之间，整个氨基酸顺序有78%是相同的，而任何其它成对的酶之间仅有40—50%是相同的[3b]。主要氨基酸附近的氨基酸顺序也非常相似（图3.6）。胰蛋白酶[20]和弹性蛋白酶[3b]的三级结构显示出，它们整个分子的折叠方式与胰凝乳蛋白酶 A 一样，并且电荷传递系统（图 3.5）也是一样的，这表示各种酶具有共同的催化机理。至于各种酶有不同的专一性这一点，只能用在底物结合凹穴处有几个特殊的替换来解释[17a]。很明显，四种酶显然是衍生于共同起源的基因，并且成为在结构上与丝氨酸蛋白酶有关系的较广泛的族系的成员（图3.6，3.2、3.3节）。这些分析还指出，相对地讲，演发不同的底物专一性比产生新的催化作用机制要简单得多。结果弄清楚了，这可能是酶进化的一般规律。尽管胰蛋白酶原和弹性蛋白酶原的三级结构还未解决，但在激活酶中，N 末端异亮氨酸16或缬氨酸16与天冬氨酸 194 之间存在同样的离子对，显

酶	A	B	C	参考文献
牛胰凝乳蛋白酶A、B	异亮-缬-天冬酰胺-甘	色-缬-缬-苏-丙-丙-组-半胱-甘	半胱-甲硫-甘-天冬-丝-甘-甘-脯-亮	〔3b〕
牛胰蛋白酶	异亮-缬-甘-甘	色-缬-缬-丝-丙-丙-组-半胱-色	半胱-谷氨酰胺-甘-天冬-丝-甘-甘-脯-缬	〔3b〕
猪弹性蛋白酶	缬-缬-甘-甘	色-缬-甲硫-苏-丙-丙-组-半胱-缬	半胱-谷氨酰胺-甘-天冬-丝-甘-甘-脯-亮	〔3b〕
牛凝血酶	异亮-缬-谷-甘	色-缬-亮-苏-丙-丙-组-半胱-亮	半胱-谷-甘-天冬-丝-甘-甘-脯-苯丙	〔3f〕
牛 Xa 因子	异亮-缬-甘-甘	酪-缬-亮-苏-丙-丙-组-半胱-亮	半胱-谷氨酰胺-甘-天冬-丝-甘-甘-脯-组	〔32〕
牛IXc因子	缬-缬-甘-甘		半胱-谷氨酰胺-甘天冬-丝-甘-甘-脯-组	〔33〕
人$C\bar{I}s$	异亮-		半胱-甘-赖-天冬-丝-甘-谷-甘-精	〔34〕

图3.6 哺乳动物丝氨酸蛋白酶之间序列的同源性。残基号码是指胰凝乳蛋白酶原。A——氨基末端序列；B、C——电荷替换系统残基周围的序列。

示了这两个酶的激活机理基本上是类似的。

羧肽酶A和B这两个同功酶的氨基酸序列，有51%是相同的〔11〕。已经解决了分辨率为2 Å的羧肽酶A〔3e〕（不是羧肽酶B）的三级结构，但酶原的构象和因激活而发生的结构改变，都还没有搞清楚。

3.1.4 尚未解决的问题

尽管现在对胰脏的蛋白酶及其前体的结构已了解得非常清楚,并且尚未解决的那些空白，5年之内就会填补，但最近

分析表明，实际上是通过肠激酶、肠促胰液肽及肠促胰酶素发挥控制作用。正是由于1902年发现了肠促胰液肽[21]，这才导致引用激素这个术语来描述影响细胞代谢的分子，以有别在细胞中被合成的分子。然而促进这些激素外吐作用的机理，甚至外吐作用时所发生的分子变化，都不清楚[22]。有关激素作用机理的一些晚近看法，将在第四章中讨论。究竟是肠激酶的分泌受到控制，还是肠激酶（和其它肠肽酶）被合成为酶原，都还不清楚。

胰脏分泌各种各样的其它水解酶，它们降解核酸（核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶）、碳水化合物（α-淀粉酶）和脂肪（各种脂酶）。究竟这些水解酶是和蛋白酶一样被一些相同的酶原颗粒所分泌呢？还是所有的蛋白酶确实只被一种类型的酶原颗粒分泌呢？这就提出一个问题：各种胰脏水解酶的选择性分泌是否可能。有一个肯定的证据就是：长期改变饮食，就能影响所分泌的胰脏水解酶的比例。不过这也可能只是反映在酶合成水平上受到控制，并不是分泌速度有什么不同[4b]。

已经证明，有一种胰脏脂酶——磷脂酶A，是以酶原（由130个氨基酸组成）的形式分泌的，并且可被胰蛋白酶将N末端的一个精氨酸-丙氨酸键切掉7个残基而被激活[23]。虽然还未发现过其它水解酶的前体，但对很多关于酶原形成的理论上的推论（3.1.2节）同样适用，可能只有找到了制备能使所有的胰脏蛋白酶都完全失活的提取物的方法后，才可能发现这些酶的酶原，因为在酶原的性质方面，显然是它们对蛋白水解激活作用非常敏感。换言之，其它一些水解酶可能也以酶原的形式合成出来，不过在分泌出来以前，它们裹入酶原颗粒期间就转变成活化形了。

3.2 血液凝固的分子学基础

当组织中的血管受到损伤时，有三种因素可以使失血减到最少；即在受伤部位的血管收缩、血小板凝集及血液凝块。尽管人们对血凝的控制机理远没有完全了解，但过去五年中，对这方面的研究已有了特别显著的进展，似乎是处于指数增长的状态。这是基于这样的事实，即所有的因子（其中有些仅微量存在）只是最近才获得高度纯化的、未降解的形式，而且彼此可以完全分离开。这也使得人们能够明确地研究它们的相互作用以及激活机理。最近有两篇关于这个问题的卓越评论[24,25]，本节的目的，就是概略地介绍有关通过限制性蛋白水解进行酶调节的这一经典系统的近代观点。

在体外已观察到两种不同的血凝机理，称作内源性途径和外源性途径（图3.7，3.8）。内源性系统只利用在血浆中存在的因子；而外源性系统既利用存在于血浆的因子，也利用组织提取物中的因子。尽管在体外这两种途径可以分开，但根据缺乏这些因子的患出血症的患者来判断，在体内这两种机理都是重要的[28]。这些遗传突变种，对于鉴定和确定这些调节途径的步骤，是非常有价值的。这两种途径可能是相互起作用的，但在体内根据各自所占优势的特殊情况，作用程度有所不同。

内源性途径中，很多凝集因子以分段作用的方式相互作用，最后使得纤维蛋白原转变为纤维蛋白。纤维蛋白的头尾相接，并且侧聚形成一个不溶性纤维蛋白凝块，这个凝块被因子XⅢa 所稳定。它是一个转谷氨酰胺酶，该酶催化一个纤维蛋白分子上的谷氨酰胺侧链与另一个纤维蛋白分子上的赖氨酸侧链之间形成 ϵ（γ-谷氨酰）赖氨酸的交联。

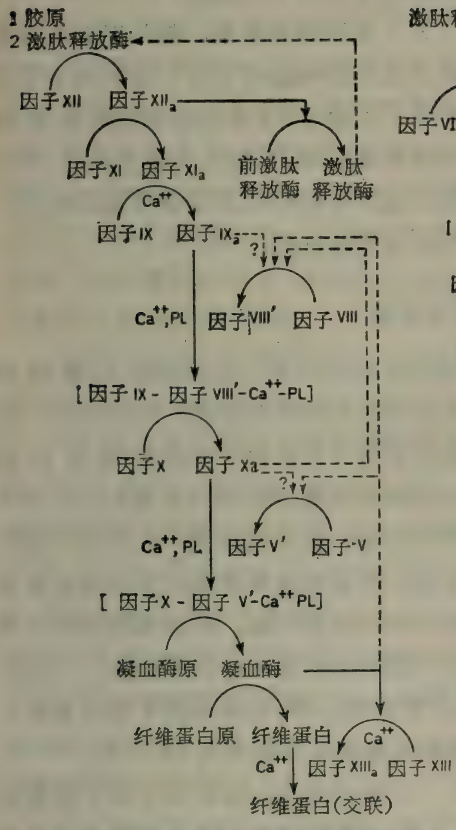


图 3.7 哺乳动物血浆内源性系统中血凝起始作用的假设机理[25]。PL——磷脂，a——凝血因子的活化形。

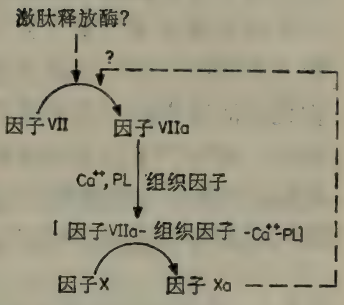


图3.8 通过外源性系统而起始血凝作用的可能机理。缩写字同图 3.7 [25; 26; 27]。

内源性途径是扩大现象的典型例子（3.1 节），并能部分地解释在短暂的延缓期之后，非常突然地形成纤维凝块的问题。然而有两种也能增进反应速度的附加因子：一是由开始的极微量因子Xa 和所形成的凝血酶而对因子Ⅷ和因子Ⅴ产生**反馈激活**（图 3.7），二是在磷脂表面上许多因子的反应，这种反应可以增加它们的有效浓度（3.2.2 节）。外源性途径设置了好几个凝血因子的旁路，并在因子X的水平上与内源性途径相遇。在此以后，两个途径就相同了。所以，在体

内，因子Ⅹ可被两个不同的凝血因子所激活。

因子Ⅻ、Ⅺ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅶ和凝血酶原，都是无活性的蛋白水解酶的前体；当供以适当的辅助因子时，这些因子都可催化激活顺序中下一个因子。因子ⅩⅢ是转谷氨酸酰胺酶的前体，而因子Ⅷ、Ⅴ和纤维蛋白原，可能还有组织因子，都不是酶的前体。尽管这样，它们还都可以被限制性蛋白水解，转化成具有活性或活性更高的蛋白质。

3.2.1 内源性和外源性途径

在体外，内源性途径是由因子Ⅻ与表面接触而被始动的。这个表面通常就是反应试管的玻璃管壁，而在体内，很可能是围绕着受伤血管管壁的纤维蛋白，如胶原或弹性蛋白。表面接触促使因子Ⅻ转变为激活形的因子Ⅻa，不过在试管内这个转变发生得非常慢。近来已证明，在体外，因子Ⅻa通过限制性蛋白水解，使前激肽释放酶转变成激肽释放酶。激肽释放酶是血浆中的一种蛋白酶，认为其功能之一是从一种称为激肽原的蛋白质生成具有9个残基的肽——舒缓激肽。舒缓激肽可增进血管壁的舒张，从而促进了血管舒张。在体外也证明激肽释放酶可将因子Ⅻ转变为因子Ⅻa[29]，这就提出一旦形成了头一个极微量Ⅻa，就扩大了因子Ⅻ激活的可能机理（图 3.7）。不过对血凝顺序中的这些早期阶段了解得还很少。缺乏因子Ⅻ的人，往往是在偶然情况下以及在没有严重的失血情况下被发现的，而确实，最初哈格曼查明因子Ⅻ缺损的人是死于肺血栓[28]！很有可能还有另一些激活因子Ⅻ的机理，或者还存在另一个尚不能确定的、能将因子Ⅺ转变为因子Ⅺa的因子。

因子Ⅺa可使因子Ⅸ转变为因子Ⅸa，而因子Ⅸa本身不能激活因子Ⅹ，必须先与因子Ⅷ形成复合物。晚近的证据指

出，除非因子Ⅷ先转变成因子Ⅷ′，否则它难以促进（或可能完全不会）因子Ⅸa催化激活因子X。这种催化激活作用在体外可由凝血酶来完成，或被因子Xa更有效地完成[25]。然而这就提出了因子Xa和凝血酶来自何处的问题了。一种可能性是某些因子Xa可通过外源性途径形成（图3.8），它们异常紧密地将内源性和外源性途径联接起来。此外，尚未鉴定出另一种血浆蛋白酶，它可以在体内始动因子Ⅷ转变成因子Ⅷ′。因子Ⅷ和因子Ⅷ′可以认为通过类似ATC酶（第二章）作为因子Ⅸa的调节亚基。

缺乏功能性因子Ⅷ的病人，患有众所周知的血友病。这是最普通的凝血障碍性疾病，每10,000个新生儿中可有1名[28]。由于血友病的基因存在于X染色体上，所以一般女性只是这种病的携带者，而绝大多数的血友病患者是男性。最著名的血友病携带者，就是维多利亚女王。她的第五个儿子 Leopold，患有血友病，在31岁时，头部受到轻击，致使发生脑出血而死去。维多利亚女王的女儿中，有两个也是血友病携带者，并且把疾病带到欧洲另一个王室（沙皇俄国）家族，这对俄国沙皇继承王位的问题特别重要，因为维多利亚女王的女儿 Alice 与沙皇尼古拉二世结婚后的独生子，也患血友病，14岁便丧了命[30]。

因子Xa 和因子Ⅴ催化凝血酶原转变为凝血酶，与因子X被因子Ⅸa-因子Ⅷ′复合体的激活非常相似，其中因子Ⅴ起着和因子Ⅷ′一样的作用。然而和因子Ⅷ的作用不一样，尽管因子Ⅴ的活力由于转变成因子Ⅴ′而显著增加，但因子Ⅴ似乎是可以促进因子Xa 催化形成凝血酶。在体外，这个反应是被凝血酶、也或许是被因子Xa 催化的。

外源性系统使因子X转变为因子Xa 的机理仍不十分清楚。最近已经明白，因子Ⅶ可以被转变成蛋白水解酶因子

Ⅶa。但是，因子Ⅹ向因子Ⅹa 的转变仍然需要组织因子[27]。组织因子可能是起着与因子Ⅴ′和因子Ⅷ′相类似的作用。在体外，因子Ⅶ可被因子Ⅹa非常有效地转变为因子Ⅶa。然而在体内是什么因子始动因子Ⅶ的激活，尽管最近有人提出是激肽释放酶，但仍是一个未解决的问题[26]。

因子Ⅸa-因子 Ⅷ′或因子Ⅶa-组织因子使因子Ⅹ转变为因子Ⅹa，以及因子Ⅹa-因子Ⅴ′使凝血酶原转变为凝血酶的过程中，绝对需要Ca^{++}及磷脂，而因子Ⅺa 使因子Ⅸ转变为Ⅸa 的过程，则需要有Ca^{++}。关于这些需要，最近已提出一个精辟的分子解释，将在3.2.3节中介绍。

3.2.2 血小板在血液凝固中的作用[24,25]

血小板的重要性远不止它在损伤部位所起的凝集作用。凝集作用可以引起血小板中释放出各种化合物。这些化合物包括刺激收缩血管的5-羟色胺激素及在凝集过程中好几个步骤都需要的磷脂。血小板还分泌一种特殊类型的因子ⅩⅢ，这种类型的因子 ⅩⅢ，在体外由于凝血酶的作用而转变成因子ⅩⅢa，其转变速度比血浆中的因子ⅩⅢ的要快得多。还有报道说，血小板释放一种能将因子Ⅸ转变为因子Ⅸa的因子，因而建立了因子Ⅻ及因子Ⅺ的旁路[31]。如果这个报道属实的话，则这将是始动内源性系统的一个极其重要的机理。由于凝血酶始动了血小板的凝集作用，那么显然，血小板功能和血液凝固之间的相互关系是相当复杂的。似乎血小板还能释放一些尚未被鉴定的其它调节血凝的因子。

3.2.3 凝血因子激活的分子变化过程

蛋白水解酶——因子Ⅻa、因子Ⅺa、因子Ⅸa、因子Ⅶa、因子Ⅹa和凝血酶，都能被 DFP（与一个特殊的丝氨酸残基

作用）抑制。上述丝氨酸周围的氨基酸序列与因子 Ⅸa、因子Ⅹa及凝血酶的其它活性部位的氨基酸序列彼此几乎一样，与胰脏肽链内切酶也几乎一样。而且，酶原激活时所产生的N末端序列，也类似于胰脏蛋白酶（图 3.6）。这些结果与凝血酶[3f]和因子Ⅹa[32]的全部氨基酸序列联在一起提示，这些活化状态的血凝因子（在肝脏中合成）和胰脏蛋白酶，都是由同一祖先蛋白质进化来的，并以同样的催化机理而发挥作用。还提示，每种酶原中的敏感键，一旦被切开，那么导致产生活性的结构转变，可能也非常相似。

因子Ⅸa或因子Ⅶa催化因子Ⅹ向因子Ⅹa的转变中，涉及到断开同样的精氨酸-异亮氨酸键的这一过程[35]。因子Ⅺa催化因子Ⅸ转变为因子Ⅸa中，则涉及到起初断开并不产生激活作用的精氨酸-丙氨酸键，继而再断开具有激活作用的精氨酸-缬氨酸键这两种过程。凝血酶原转变成凝血酶，起初则需要断开但不产生激活作用的精氨酸-苏氨酸键，其后再断开具有激活作用的精氨酸-异亮氨酸键这两个过程。当纤维蛋白原向纤维蛋白转变时，凝血酶断开四个精氨酸-甘氨酸键，而在因子ⅩⅢ向因子ⅩⅢa 转变中，凝血酶则断开一个精氨酸-甘氨酸键。所以，各种激活作用只通过切断很少几个肽键就可以完成。这类酶的专一性与胰蛋白酶都非常相似，而且胰蛋白酶也确实能够模拟因子Ⅸa和因子Ⅹ的作用。然而，凝血因子是一些专一性特别强的蛋白酶，它能只切断一种或两种蛋白质中一个或两个键。其原因可能是由于这个酶识别较长的氨基酸序列的能力，胜过识别只有精氨酸-Ⅹ单一键的能力，就像肠激酶的情况那样。因此，凝血酶原的两个因子Ⅹa敏感的键，都连接着同样的异亮氨酸-谷氨酸-甘氨酸-精氨酸序列，这一点是很有意义的[36]。

凝血酶原是四种凝血因子（因子Ⅸ、Ⅶ及Ⅹ）之一，这

四种因子在其生物合成时均需要维生素K[37]。缺乏维生素K的动物，则合成一种异常的凝血酶原，尽管在体外这种凝血酶原可被胰蛋白酶激活，而表明其活性中心并未损害，可是在体内，它不能结合 Ca^{++}，也不能被激活。现已发现，正常的凝血酶原含有一种氨基酸——γ-羧基谷氨酸（Gla），而以前在蛋白质N末端的7和8、15和17、20和21、26和27、30和33[38,39]位置上，却从来没有发现过它。在缺乏维生素K的动物中，这些残基就是谷氨酸。这样上述异常的钙结合就得到解释：Ca^{++} 应与两个邻近的 Gla 残基非常紧密地结合，就像 Ca^{++} 和乙二胺四乙酸（EDFA）相结合那样。磷脂键通过已经与Gla结合的 Ca^{++}，而与凝血酶原结合，这就可使因子 Xa-因子Ⅴ′复合物与凝血酶原结合，并且始动激活作用。因为因子X在与凝血酶原相类似的位置上有邻近的“谷氨酸”残基[40]，所以也就像因子Ⅸ的情况一样[41]，似乎这些残基也是 Gla，并且似乎这些酶原以与凝血酶原完全类似的机理发生激活作用。这些结果为维生素K的功能提供了令人振奋的线索，它对将谷氨酸转变成γ-羧基谷氨酸的酶系统的活性，可能是很重要的。

3.3 补体系统的激活[42]

当哺乳动物被外来的有机体（如入侵的细菌）感染时，它的第一步反应就是产生特异的抗体，它能与入侵细胞形成一个免疫复合体。第二步反应就涉及到补体，补体是一组血浆蛋白质，它首先能识别免疫复合体，而后能使入侵细胞发生结构性损伤。第三步是血浆中的白细胞、单核细胞和巨噬细胞吞噬已受损的入侵细胞。在经典的补体途径中（图3.9），补体成份C1r·C1s 和 C2 是蛋白酶的前体，而

补体成份 C3、C4 和 C5 则可被限制性蛋白水解，转变成为功能性衍生物。

当C1复合体识别入侵细胞和 IgG 或 IgM 免疫球蛋白的免疫复合体时，就开始一系列的过程。这一识别可受到能与抗体专一性结合的 C1q的影响。曾有人假定，这些相互作用可引起C1q的构象改变，继而引起C1r构象改变，使 C1r 转变成蛋白酶 $C1_{\bar{r}}$。然后 $C1_{\bar{r}}$断开C1s 中一个肽键，使它转变为蛋白酶 $C1_{\bar{s}}$。$C1_{\bar{s}}$ 可被 DFP 抑制，而修饰了的丝氨酸周围的氨基酸序列表明它是丝氨酸蛋白酶类中的另一个成员（图3.6）。

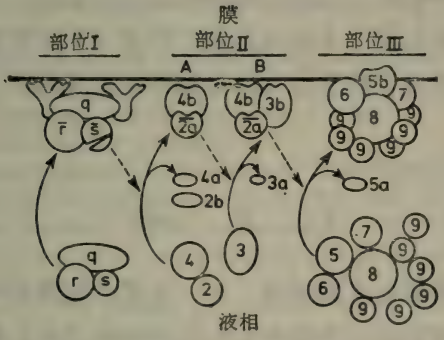


图3.9 经典的补体系统的图解。q、r 和 s 指的是C1复合体的亚基，a、b 分别表示为修饰因子的N和C末端片段，横线表示蛋白酶[42]。

然后 $C1_{\bar{s}}$断开C2 和 C4 的肽键。C4、C4b 的C末端片段，就能与入侵细胞膜上的另一部位结合。C2、C2a 的N末端片段，只有在与 C4b 复合后才可变成蛋白酶。然后 $C2_{\bar{a}}$-C4b 复合体断开C3。这样 $AC2_{\bar{a}}$-C4b-C3b 复合体就能断开C5。C5b 有能力触发在膜第 3 个位置上形成的其余所有的补体成份的复合体，而并不发生蛋白水解。将 C5b-9复合体

嵌入膜中，在某些方面破坏了膜的规则结构，而使膜易于泄漏。

$C2a$-$C4b$ 和 $C2_{\overline{a}}$-$C4b$-$C3b$ 复合体，是高度专一化的蛋白酶的例子。现已知道的唯一的底物，在 $C2_{\overline{a}}$-$C4b$ 是 C3，在$C2_{\overline{a}}$-$C4b$-$C3b$是C5。所以$C2_{\overline{a}}$就是一种能通过 C4b 和 C3b 两个调节亚基的存在，来测定其专一性的蛋白酶的突出例子。

C3b 和C4b 与细胞膜结合，似乎也促进白细胞、单核细胞和巨噬细胞吞噬具有补体的颗粒。另外，在补体系统中（图3.9）不直接利用C3和 C5片段，本身就有几种生物学作用；例如，它们可以刺激白细胞的向化性移动。

血浆中存在第二个补体系统，它在 C3 水平上汇入经典途径。这个系统识别包含 IgA免疫球蛋白在内的一些免疫复合体。

3.4 小　　结

“限制性蛋白水解作用，是一个具有高度专一性的不可逆过程，它可以通过将前体蛋白质转变成具有生物活性的形式，而起始生理功能[6]。”它是用以调节真核细胞许多过程的机制，不仅包括消化、血液凝固和防御，而且包括许多肽激素的作用[43]及结缔组织的合成[44]。

大多数作为前体形式合成的酶是蛋白酶。不过有三种酶例外，即胰磷脂酶A、因子 XⅢa 和聚乙酰氨基葡萄糖合成酶[45]，后者在出芽酵母中，则形成N-乙酰葡糖胺聚合物。

哺乳动物酶的遗传变异体（它常是病人患特殊遗传疾病的起因），在建立体内的限制性蛋白水解途径方面是很有价值的，就像在第二章讨论的细菌酶的情况一样。

鉴于在血凝作用和补体领域研究方面的主要进展、发现被合成为没有活性前体的蛋白质数目迅速不断的增多。加之有关在真核细胞蛋白质和酶转换的调节中蛋白酶所起的作用的最新研究，通过限制性蛋白水解作用对酶活性进行控制似乎将成为下一个十年的主要发展领域。

参 考 文 献

〔1〕Northrop,J.H.,Kunitz, M. and Herriott, R .M. (1948), In *Crystalline Enzymes*,Columbia University Press,New York.

〔2〕Sjoström,H. and Noren, O.(1974),*Biochem. Biophys. Acta*, 359,177-185.

〔3〕The Enzymes III(3rd Edition), (Ed.) Boyer, P.D. Academic Press, London.(a)Delange,R. J.and Smith,E.L. 81-118;(b) Hartley, B.S. and Shotton, D.M. 323-373;(c)Kraut, J. 165-183;(d)Blow,D.M. 185-212;
(e)Hartsuck,J.and Lipscomb, W.N.1-56;
(f)Magnusson,F.,277-321.

〔4〕*Gastrointestinal Physiology-MTP International Review of Science*(1974), Butterworths, London and University Park Press,Baltimore.(Edts.)Jacobson,E.D. and Shanbour, L.L. (a)Johnson,L.R.,1-43;(b)Preshaw,R.M.265-291.

〔5〕Hadorn,B.,Tarlow,M. J., Lloyd, J. K. and Wolff, O. H. (1969), *The Lancet*, pp. 812-813.

〔6〕Neurath,H.,Walsh,K.A.and Gertler,A.(1974),in *Metabolic Interconversions of Enzymes*(1973), (Eds.) Fischer, E. H., Krebs,E.G., Neurath,H.and Stadtman, E. R. pp. 301-312, Springer-Verlag,Heidelberg.

〔7〕Wintersberger.E.,Cox,D.J.and Neurath, H. (1962), *Biochemistry*, 1,1069-1078.

〔8〕Cox, D.J.,Wintersberger, E. and Neurath, H. (1962),*Biochemistry*,1, 1079-1082.

〔9〕Uren, J.R.and Neurath, H. (1972), *Biochemistry*, 11,4483-4492.

〔10〕Maroux,S., Baratti, J. and Desnuelle, P. (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 5031-5039.

〔11〕Titani, K., Ericsson, L. H., Walsh, K. A. and Neurath, H.(1975),*Proc.Nat.Acad.Sci.*, 72, 1666-1670.

〔12〕Ruhlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K.

and Huber, R.(1973), *J.Mol. Biol.*, 77, 417-436.
〔13〕Keller,P.J. and Allan,B.J. (1967), *J.Biol. Chem.*, 242, 281-287.
〔14〕Bartley,W.,Burt, L.M. and Banks, P.(1971), *The Biochemistry of the Tissues*, pp. 155-161, John Wiley and Son, London.
〔15〕Sigler, P.B., Blow,D.M., Matthews, B.W.and Henderson, R.(1968),*J. Mol. Biol.*,35, 143-164.
〔16〕Freer, S.T., Kraut, J.,Robertus, J.D., Wright, H.T. and Xuong, Ng.H.(1970),*Biochemistry*, 9, 1997-2009.
〔17〕Fritz and Tschesche(Eds.),(1970), *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors*, Shotton, D.,pp. 47-55, Walter de Greyter, Berlin and New York.
〔18〕Naughton, M.A., Sanger, F., Hartley, B. S. and Shaw, D.C.(1960), *Biochem. J.*, 77,149-162.
〔19〕Wright,H.T.(1973),*J.Mol.Biol.*, 79, 1-11 and 13-23.
〔20〕Stround, R.M., Kay,L.M.and Dickerson, R. E. (1974) ,*J. Mol. Biol.*, 83, 185-208.
〔21〕Bayliss,W. M. and Starling, E. H. (1902),*J. Physiol.*, 28, 325-353.
〔22〕Douglass, W.W.(1974), *Biochem. Soc. Symp.*, 51,1-28.
〔23〕De Haas, G.H., Slotboom,A.J., Bonsen, P. P. N., Van Deenen, L.L.M.,Maraux, S., Puigserver, A.and Desnuelle, P.(1970), *Biochem. Biophys. Acta*,221,31-53.
〔24〕Davie, E. W. and Kirby, E.P. (1973), *Curr. Top. Cell. Reg.*, 7, 51-86,
〔25〕Davie, E.W. and Fujikawa, K.(1975),*Ann. Rev.Biochem.*, 44,799-829,
〔26〕Gjonnaess, H.(1972),*Thromb. Diath. Haemorrh.*, 28, 182-193, 194-205.
〔27〕Radcliffe, R.and Nemerson, Y.(1975), *J.Biol. Chem.*,250, 388-395.
〔28〕Ratnoff, O.D.(1973), In '*The Molecular Basic of Inherited Disease*'pp. 1670-1709, (*eds.*) Stanbury,J.B., Wyngaarden, J. B. and Fredrickson, D. S.; McGraw-Hill, New York.
〔29〕Weiss.A.S., Gallin, J.I.and Kaplan, A.P. (1974), *J. Clin Invest.*, 53, 622-633.
〔30〕McKusick, V.A.(1965), *Scientific American*, 213,88-95.
〔31〕Schiffman,S.,Rapaport, S.I.and Chang, M. M. Y. (1973),

Brit.J.Haematol., 24,633–642.
〔32〕 Titani, K., Fujikawa, K.,Enfield, D. L., Ericsson,L. H., Walsh,K.A. and Neurath.H.(1975), *Proc. Nat.Acad. Sci.*, 72,3082–3086.
〔33〕 Enfield, D.L., Ericsson, L.H., Fujikawa, K., Titani,K., Walsh,K.A. and Neurath, H. (1974), *FEBS. Letters*, 47, 132–135.
〔34〕 Fothergill, J.E., University of Aberdeen, (Personal Communication).
〔35〕 Fujikawa, K.,Coan, M.H., Legaz, M.E. and Davie,E.W. (1974), *Biochemistry*, 13, 5290–5299.
〔36〕 Sottrup-Jensen, L.,Zajdel, M., Claeys, H.,Petersen, T.E. and Magnusson. S.(1975),*Proc.Nat. Acad. Sci.*, 72, 2577–2581.
〔37〕 Stenflo,J.(1974),*J.Biol.Chem.*,249,5527–5535.
〔38〕 Stenflo,J., Fernlund,P., Egan, W., Roepstorff,P. (1974), *Proc.Nat. Acad. Sci.*, 71, 2730–2733.
〔39〕 Morris, H.R., Thompson, M.R. and Dell, A.(1975), *Biochem. Biophys. Res.Commun.*,62, 856–861.
〔40〕 Enfield, D.L., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath, H.and Titani, K.(1975),*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 16–19.
〔41〕 Fujikawa, K., Coan. M.H., Enfield, D. L., Titani, K., Ericsson, L.H.and Davie, E.W.(1974), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 427–430.
〔42〕 Muller-Eberhard, H. J. (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 697–724.
〔43〕 Tager, H. S. and Šteiner, D. F. (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, 509–538.
〔44〕 Bornstein, P.(1974), *Ann.Rev.Biochem.*, 43, 567–603.
〔45〕 Cabib, E.and Farkas, V.(1971),*Proc. Nat. Acad. Sci.*,68, 2052–2056.

第四章 糖原代谢的调节及激素作用的分子学基础

4.1 糖原的生物学重要性；科里(Cori)循环

糖原代谢是可论证的，比其它已知的代谢控制系统更有助于了解酶调节作用的生物化学途径。人们正是用这样一个系统作为描述酶活性受变构效应物（由 AMP 激活磷酸化酶）控制的第一个例子[1]； 也正是通过这样一个系统发现了可逆性共价改变（磷酸化）对酶的调节作用[2] 。糖原代谢中另外一些首先值得注意的问题是 UDPG 的鉴定， 它导致发现了很多利用这个核苷二磷酸的糖衍生物的合成途径[3]（L.F.Leloir，1970年诺贝尔奖金获得者）；还导致发现了 cAMP ，cAMP 开辟了激素作用的分子基础的整个领域[4]（E.W.Sutherland，1971年诺贝尔奖金获得者）。

糖原是哺乳动物细胞中糖类的基本贮存形式。从量上讲，至少有95%的聚合物贮存于骨骼肌及肝脏中，在那里充分发挥着各不相同的作用。在骨骼肌中，糖原通过无氧糖原酵解作用转变为乳酸，以提供为维持肌肉收缩所需要的大量的ATP。肌肉中的糖原分解由于缺乏葡萄糖-6-磷酸酶而不会导致明显的葡萄糖生成，并且因为还缺少将丙酮酸恢复为磷酸烯醇丙酮酸所必须的两种酶——丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶，因此糖原转变为乳酸是单向的。当肌肉收缩时，产生的大量乳酸扩散到血流中，然后再返回到肝

脏。以后它或是转化成糖原，然后再转化成血糖，或是直接转化成血糖。因此，肝糖原在控制血糖浓度方面就具有重要的作用。当然这种调节对于象脑这样的组织是密切有关的，对脑来说几乎完全依赖葡萄糖作为能量来源。肌糖原转变成乳酸，转变成肝糖原，再转变成血糖（其中某些被利用于再合成肌糖原）。由于是 Cori 发现的，因而被命名为科里循环[5]（C.F.Cori 和 G.T.Cori,1947年诺贝尔奖金获得者）（图4.1）。

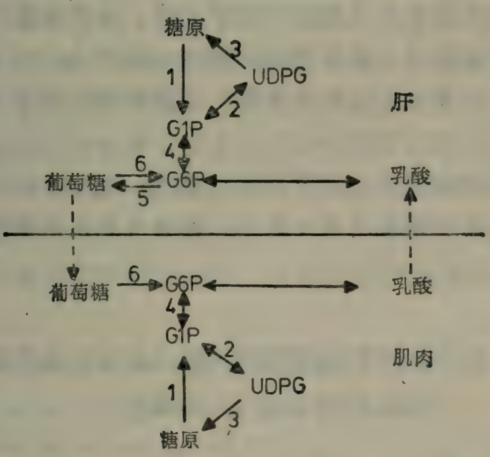


图4.1 科里循环。酶：1 ——磷酸化酶；2 ——UDPG 焦磷酸化酶；3 ——糖原合成酶；4 ——磷酸葡糖变位酶；5 ——葡萄糖-6-磷酸酶；6 ——己糖激酶。糖原分支酶和脱支酶被省略。

糖原的动员受四种激素的影响：

（1）肾上腺髓质释放的儿茶酚胺肾上腺素，促进肌肉中的糖原转化成乳酸，以及促进肝脏中的糖原转化成葡萄糖。

（2）交感神经末梢释放的儿茶酚胺、去甲肾上腺素，促进肝脏中的糖原分解，但在骨骼肌则否，因为骨骼肌不受交感神经支配。

（3）胰脏α-细胞分泌的肽激素胰高血糖素，可促动肝脏糖原分解，但对肌肉就没有作用。

（4）胰脏β-细胞分泌的肽激素——胰岛素，可加速葡萄糖转运到肌肉，并加快肌肉和肝脏中糖原合成的速率。胰岛素不影响血糖向肝细胞的转运，因为甚至在缺乏激素时，血糖也是可以自由透过肝细胞的。胰高血糖素和肾上腺素也可促进肝脏的乳酸转变为葡萄糖，而胰岛素则抑制这个过程。所以就是以儿茶酚胺和胰高血糖素为一方而胰岛素为另一方，依靠它们之间的平衡，就能精确地调节血液中的葡萄糖。

本章论及两个生理学问题：第一，糖原分解的速率如何与肌肉起动收缩同步化？第二，什么是激素控制糖原代谢的机理？

4.2 骨骼肌的糖原分解；AMP和磷酸化作用对磷酸化酶的调节[6]

糖原分解的限速酶是磷酸化酶（图4.1），该酶催化把α-1，4连接的葡萄糖基连续磷酸解为葡萄糖-1-磷酸盐（G1P)。早在1938年，科里就已经将磷酸化酶分离为a和b两种形式[1]。磷酸化酶b的活性完全依赖AMP，而磷酸化酶a无需AMP就能显出几乎完全的活性。据推测，磷酸化酶a必定含有结合得很紧的AMP，而且在肌肉中还发现另一个可把磷酸化酶a转变成b的酶（称作辅基移除酶或PR-酶），此酶可除去被结合的AMP[7]。然而，这个推测过去

一直未能得到证实，过了近20年才发现了其反应的真实性质。1956年 Krebs 和Fischer[2] 证明，磷酸化酶 b 可以由需要 Mg-ATP的磷酸化酶激酶来催化，通过蛋白质磷酸化作用而转变成磷酸化酶 a 。因而，把磷酸化酶 a 恢复到磷酸化酶 b 的就是磷酸释放酶（或简称PR，phosphate releasing)，现在称作磷酸化酶磷酸酶。

磷酸化酶 b 是一个由两个相同的 100,000 道尔顿亚基组成的二聚体[6]。由于 ATP 的 r-磷酰基转移到了位于 N 末端第14个残基独特的丝氨酸羟基上，从而转化为磷酸化酶 a（图4.2）。磷酸化酶 a 的分子量是磷酸化酶 b 的两倍（前者为400,000道尔顿，后者为200,000道尔顿），最初曾有人认为这种分子量的加倍作用，是激活过程整合作用的一部份，以致磷酸化酶磷酸酶曾一度被称作为磷酸化酶破裂酶〔简称PR!（phosphorylase rupturing)〕。不过，通过能够同时检测酶活性和分子大小的改变的荧光技术，证明二聚化作用开始得慢，比激活作用迟几分钟。从而说明在体内未必有什么联系[9]。

在体外试验中，当底物无机磷酸盐(P_i)的浓度增加时，

N-乙酰-ser-arg-pro-Leu-ser-asp-gln-glu-lys-arg-
lys-gln-ile-ser-val-arg-gly-leu
                  |
                  P

图4.2 兔骨骼肌磷酸化酶 a 的末端氨基酸序列[8]。

AMP 的K_a降低，反之，当 AMP 浓度增加时，P_i 的 K_m 降低[10]。所以磷酸化酶 b 的活性既与 P_i 又与AMP 的浓度变化密切相关，尤其是当活性与 AMP 浓度的关系呈 S 形曲线的时候。由于 AMP 对磷酸化酶 b 的激活作用可被 ATP 和葡萄糖-6-磷酸（G6P）所拮抗，所以体内磷酸化酶 b

的活性就应该是代谢物比值 $AMP + P_i / ATP + G6P$[11] 的函数。

只有在底物饱和浓度的条件下，缺乏 AMP 时，磷酸化酶 a 才具有充分的活性。如果P_i浓度从10mM降到 1mM，则磷酸化酶 a 也就变为完全依赖于 AMP 了，特别是在生理性温度（37℃）的情况下更是如此[12]。此外，体外磷酸化酶 a 的 AMP K_a比磷酸化酶 b 的K_a低50—100倍。因为骨骼肌中 AMP 的浓度大约是0.05mM（见4.5节），这一浓度低于磷酸化酶的浓度（0.1mM），暗示着在体内 AMP 将优先与磷酸化酶 a 结合。

这些发现有力地说明，在体外试验并模拟体内的 pH 值、离子组成、温度和代谢物浓度，对研究酶活性的控制是多么重要。在酶学中的常规测定条件下，即在最适 pH 时，饱和底物浓度及25或30℃的温度，测得的结果可能会是一个非常令人迷惑不解的酶动力学特性。本章的其它小节将另有解释这一问题的例子。

4.3 肌肉收缩的控制[13,14,15a,b]

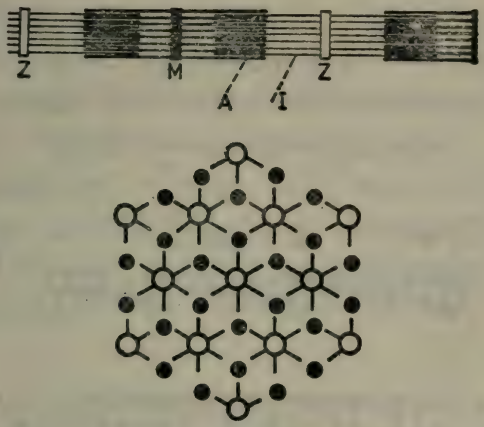
为了充分了解糖原分解和肌肉收缩的相互关系，有必要概述有关肌肉收缩过程的近代观点。

骨骼肌纤维由两种有规则排列的称作A丝和I丝所组成（图4.3）。肌肉收缩就是I丝（主要由肌动蛋白组成）滑过A丝（主要由肌球蛋白组成）的过程。这样就缩短了纤维的总长度（虽然体积不变），并且产生了张力。

哺乳动物骨骼肌肌球蛋白具有$H_2La_2Lb_2$结构，其中两条相同的“重”H链的分子量大约是 200,000 道尔顿（实际上它是所有已知多肽链中最长者），两条“轻”链 La 和 Lb 的分

子量接近20,000道尔顿。在电子显微镜下，可以看到每个肌

(a)



(b)

图4.3 图示A丝和I丝的排列。(a)肌小节的纵剖面。肌小节是肌原纤维的重覆单位，数千个肌小节组成一个肌肉纤维。M线是在显微镜下看到A丝上的交叉线纹。(b) 肌原纤维的纵剖面。黑点表示I丝，圆圈表示A丝，A丝上有肌球蛋白的横桥突起[13,14]。

球蛋白分子呈双螺旋棒，它的末端是两个称作横桥的球状头。“轻”链独占头部区域。肌球蛋白分子在A丝中与横桥突起以有序的螺旋方式包裹在一起（图4.4）。这些横桥具有ATP酶的活性，所以肌球蛋白实际上是一个酶。当肌肉收缩肌动蛋白向肌球蛋白滑动时，牵扯了肌动蛋白与肌球蛋白的头部区域相互作用，并同时被肌动球蛋白ATP酶激活100倍或更多。据认肌动蛋白和肌球蛋白的键合是产生力的机制，ATP的水解则为完成机械功提供了能量。

肌动蛋白的单体是一个球形蛋白质（分子量为45,000道尔顿），在I丝中，它聚合成双股螺旋形排列。I丝还含有另外两种蛋白质，肌钙蛋白和纤维状蛋白质原肌球蛋白。肌钙蛋白是三个亚基的复合物，即TN-T（分子量为37,000道尔

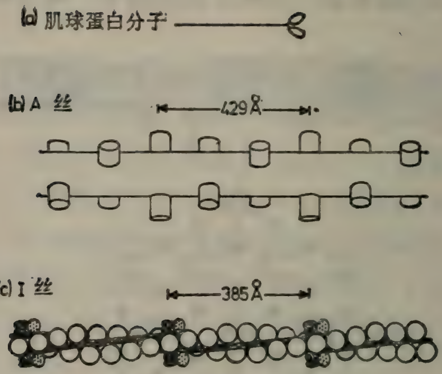


图4.4 A丝和I丝的图解。(a) 单个肌球蛋白分子；(b) 一条A丝：每一个横桥与前一个横桥处呈120°旋转。6个横桥组成一个长达429埃的完整周期；(c)一条I丝：一个肌钙蛋白分子与每个第7位的肌动蛋白单体相连接。每个肌钙蛋白分子可能含有相等数量的 TN-T（㊂）TN-I（◍）和TN-C（●）单位。黑线表示原肌球蛋白，它横卧在肌动蛋白丝状纤维上的每道沟中[15a]。

顿）、TN-I（分子量为23,000道尔顿）和 TN-C（分子量为19,000道尔顿）。在肌肉静息时，原肌球蛋白和 TN-I 似乎是阻止肌动蛋白与肌球蛋白相互作用，并因此而激活肌球蛋白的 ATP 酶的两种组份。在肌肉静息时，由于主动转运的机理，肌肉细胞中所有的 Ca^{++} 都保留在围绕着肌球纤维、称作肌浆网的膜系统中。随着神经的兴奋，由于某些尚不清楚的作用机理，使肌浆网变成可以让 Ca^{++} 通过，并且肌肉胞浆中的 Ca^{++} 浓度从低于 $0.1\mu M$ 升高到约 $10\mu M$。Ca^{++} 与 TN-C 结合，这种结合作用抵销了原肌球蛋白 TN-I 对肌动球蛋白 ATP 酶的抑制作用，于是 ATP 被水解，并始动肌肉收缩。TN-T 所起的作用还不完全清楚，不过它可与原肌球

蛋白相互作用，并且对于在重建系统中完全恢复对Ca^{++}的敏感性方面，TN-T是很必要的。当神经兴奋停止，Ca^{++}迅速返回肌浆网，收缩也就停止了。

所以可以认为，可收缩的蛋白质象一个由9种亚基组成的相当复杂的酶。它有一个催化亚基(不是肌球蛋白的“重”链就是它的一个“轻”链）和很多调节亚基,其中之一TN-C，可与变构的激活剂Ca^{++}结合。与Ca^{++}的结合触发了一系列变构性转换，从而导致激活ATP酶，并使肌小节的长度缩短了20—50%。Ca^{++}的浓度是通过作用于肌浆网的神经冲动而自身控制的。

4.4 糖原分解和肌肉收缩的同步化；C_a^{++}对磷酸化酶激酶的激活[6,15c,16]

由于肌动球蛋白ATP酶的活性能在几毫秒钟内增加100倍以上，使肌肉呈最大的张力，并且在静息肌肉中的ATP（约7mM）只够支持肌肉作少于1秒钟的强力收缩，因此，当ATP水解以后，必需有一个有效的再生ATP的机制。所贮存的磷酸肌酸(25mM)可使这个机制再维持几秒钟，但是若超出这个时间，就只能靠由糖原转变成乳酸而从ADP再生ATP。所以当了解到在起动收缩的几秒钟内糖原分解率能比肌肉静息时的基本糖原分解率增加数百倍时，也就不足为奇了。这自然地意味着磷酸化酶活性的相应增加，从前面的讨论来看，理论上讲，这种活性的增加或是由于磷酸化作用，或是由于代谢物浓度的改变。

现在已完全证实，磷酸化酶几乎全是以b形式存在于静息肌肉中。当给予固定延续时间和固定频率的电震，使离体蛙肌肉收缩时，就可促进向磷酸化酶a形式的转变。任何刺

激频率都可使磷酸化酶a达到稳定态的水平，这可能反映了磷酸化酶激酶和磷酸化酶磷酸酶的相对活性（图4.5）。用增加频率刺激的办法，可使磷酸化酶a水平的增加加快，达到稳定态所需的时间减少。在可使肌肉强直收缩的频率刺激下，只需不到一秒钟的时间就可达到磷酸化酶a稳定水平的70%（图4.6）。还发现，增加刺激频率，糖原分解的速率也增加，在每秒钟仅0.8次刺激下，糖原分解率就可超过基本速率的100倍，那时磷酸化酶a的稳定状态水平大约是10%（图4.6）[19]。根据这些结果提出，在肌肉收缩与糖原分解的同步化中，磷酸化酶a的出现可能是一个重要的因素。这些结果还提出了关于电刺激是怎样推动向a形式转变的问题。

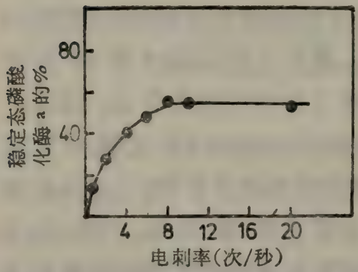


图4.5 电刺激对离体蛙缝匠肌磷酸化酶a水平的影响。在每秒钟电震两次时，达到稳定态所需时间的一半是30秒，每秒钟电震6次时，则是10秒[17]。

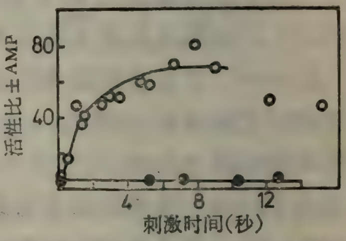


图4.6 强直收缩对原位小鼠尾股肌中磷酸化酶a的影响：o——正常小鼠（品系c-57）；●——完全缺乏磷酸化酶激酶的异常小鼠（品系I）。

如果在静息时磷酸化酶处于b的形式，那么在这些情况

下，磷酸化酶激酶必定也是无活性的，而收缩可使它转变成活性的形式。Ca^{++}显然是一个激活剂，因为发现与Ca^{++}保温培育后，肌肉提取物中的磷酸化酶激酶活性可增加50倍。其后又发现激活作用还需要另一个称作 KAF （激酶激活因子）的蛋白质参与，而后终于明确了 KAF 就是需 Ca^{++} 的蛋白酶。KAF 对磷酸化酶激酶的激活作用与前面（第三章）讲过的酶原激活作用一样。不过可以认为有两种原因使得当肌肉收缩时，KAF在调节磷酸化酶激酶的活性方面几乎不起作用。第一，激活作用是不可逆的，当收缩停止，几秒钟内磷酸化酶 a 仍然被重新恢复成磷酸化酶 b[20]。第二，Ca^{++}的K_a大约是1.0mM，这比起动收缩的浓度要高1000倍。

由于相当专一的Ca^{++}螯合剂 EGTA 的问世和完全无 Ca^{++} 试剂的应用，得以发现 Ca^{++}在很低的浓度时的二级可逆效应。已发现磷酸化酶激酶的活性完全依赖于 Ca^{++}，K_a 为0.1—1.0μM，与肌肉起动收缩时的 K_a 非常相似。在体外，磷酸化酶 b 向 a 的转变可被加入肌浆网制剂所阻断，但只要再加入Ca^{++}，转变又重新开始(图4.7)，这就有力地证明了肌肉中自然存在的 Ca^{++} 螯合剂，能成功地竞争已与磷酸化酶激酶紧密结合的 Ca^{++}。表明在体内这个过程很可能是可逆的。所以，在磷酸化酶 a 的产生与肌肉收缩的同时发生中，Ca^{++}起到重要的作用，证据是很充分的。有益的教训是：这个机理过去几年未被发现，部分原因是由于被 KAF 激活的问题，部份原因则由于体外试验时污染了玻璃器皿和一般试剂的痕量钙，其量

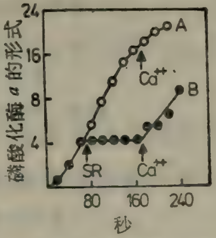


图4.7 体外肌浆网(SR)对磷酸化酶激酶抑制的依赖Ca^{++}的逆转作用。(o——o)——对照；(o——o)——反应。箭头表示加入 SR 或 Ca^{++}的时间[21]。

已经大大超过了足以完全激活磷酸化酶激酶所需的 Ca^{++}。当分离酶时，内源性蛋白酶可改变酶的调节特性，这是一个经常碰到的、如同酶脱敏那样的实验问题（第二章）。

4.5 AMP的作用；体内代谢物水平的测定

正在收缩的肌肉中 ATP、AMP和 P_i 的稳定态浓度，理论上讲应该是如图 4.8 中所示的 8 个反应的函数。尽管反应 2 可缓冲 ATP 水平，但肌肉收缩（反应 1）将使ATP趋

$$ATP \longrightarrow ADP + P_i \quad (1)$$

$$肌酸\text{-}P + ADP \rightleftharpoons 肌酸 + ATP \quad (2)$$

$$2ADP \rightleftharpoons AMP + ATP \quad (3)$$

$$糖原_n + P_i \leftarrow 糖原_{n-1} + G1P \quad (4)$$

$$G3P + NAD + P_i \rightleftharpoons 1,3DPG + NADH + H^+ \quad (5)$$

$$AMP \rightleftharpoons IMP + NH_3 \quad (6)$$

$$天冬氨酸 + GTP + IMP \longrightarrow 腺苷酸琥珀酸 + GDP + P_i \quad (7)$$

$$腺苷酸琥珀酸 \longrightarrow AMP + 延胡索酸 \quad (8)$$

图4.8 测定肌肉中 ATP、AMP 和 P_i 水平的各种反应。
酶：1——肌动球蛋白 ATP 酶；2——肌酸激酶；3——腺苷酸激酶；4——磷酸化酶；5——甘油醛-3-磷酸（G3P）脱氢酶；6——AMP脱氨酶；7——腺苷酸琥珀酸合成酶；8——腺苷酸琥珀酸酶。

于减少，P_i 趋于增加。糖原分解不仅能再生 ATP，而且还通过反应 4 和 5 消耗 P_i。通过反应 1 和 3，AMP 应与 ATP 呈相反的关系。所以 AMP 对磷酸化酶的激活作用，对于加速 ATP（这个 ATP 可以看作是糖原分解途径的终产物）的形成完全是一个合理的机制。的确，由于肌肉中 ATP 的浓度比 AMP 大得多（见下文），因此如果反应 3 达到平衡，则 ATP 的变化就应引起 AMP有百分数较大的变化。然而这

种论证只是理论上的，还不能证实肌肉收缩时AMP在加速糖原分解中发挥的作用。

在试图评价体内变构效应物的重要性时，由于哺乳动物系统不同于细菌的（第二章），因此通常不用这样一个合适的细菌突变种（它具有对某一效应物的敏感性有了改变的酶）。因此，进一步的发展取决于能测定代谢活性不同状态时的有关代谢物的浓度。遗憾的是，这种测定存在很多困难及意想不到的问题，这些问题已在本丛书的另一卷中作了充分的讨论[22]。主要问题在于，现有的测定方法只能测定整个肌肉中代谢物的平均浓度。因为哺乳动物的肌肉是由上千条肌肉纤维和好些类型的纤维组成，每一条纤维含有很多亚细胞器，所以测得的浓度值只能是相当粗略的平均值，这个值和位于肌肉胞浆中的可利用的磷酸化酶的浓度没有什么相似之处。

如果至今为止所得到的大多数的可靠数值是能够被接受的话，那么它们仍然可以用来试图评价前面讨论中所提出来的两个主要问题：

（a）为什么在静息的肌肉中磷酸化酶b没有活性（少于最大潜在活性的0.1%）？

(b) AMP在肌肉收缩激活磷酸化酶a的过程中起作用吗？

已测得哺乳动物静息时骨骼肌中P_i、ATP、AMP和G6P的浓度分别是5—10mM、7.5mM、0.05mM和0.3mM[19,23-25]。利用在体外测得的磷酸化酶b的动力学特性[10]，可以估计这些情况下的磷酸化酶b约为潜在活性的5%，这大约比静息肌肉的糖原分解的速率大100倍。

当试图估计AMP在肌肉收缩过程中的可能作用时，也出现类似的矛盾。AMP和ATP在肌肉收缩时的浓度与肌肉

静息时的浓度没有什么明显变化，而且P_i的浓度约仅增加两倍[19, 24, 25]。虽然这个结果显然可作为反证，证明肌肉收缩时 AMP 或P_i在调节磷酸化酶活性方面起作用，但是另有一些证明却使这个看法站不住脚。

首先，如果P_i的浓度经常至少保持5m*M*，AMP 至少保持0.05m*M*，那么根据体外磷酸化酶 a 的动力学特性，磷酸化酶 a 的活性应该始终是处于最大的状态。然而，当用肾上腺素灌流静息的肌肉时，磷酸化酶 a 的水平可提高50%，但糖原分解的速率仅增加10倍，说明磷酸化酶 a 是在它的潜在活性只有 1% 时就开始作用了。相反，当以一个只能将磷酸化酶 a 的稳定态提高10%的频率电刺激肌肉时，糖原分解的速度却增加了100倍（图4.5[19,20,26]）。因为P_i和AMP是这个酶仅有的已知的激活剂，所以这就再一次地提出，肌肉在静息时，这些对磷酸化酶有价值的一种或两种代谢物的浓度，要比整个肌肉所测得的平均浓度低得多。它还提示，当肌肉收缩时，无论是 AMP 还是P_i，这两种代谢物的浓度必定会显著升高。

有人利用一种完全缺乏磷酸化酶激酶活性、并且不能将磷酸化酶 b 转变成磷酸化酶 a 的品系的小鼠，做了另一个与这个问题有关的重要实验（图4.6）。结果看到它与正常小鼠不同，使肌肉产生强直收缩的频率刺激并不立即起始糖原分解。然而经过一个短暂的几秒钟的延缓期之后，便迅速发生糖原分解作用，其速度大约是正常小鼠最大速率的50%（图4.9）。从这个结果可以得出四点推论：

（1）如果向磷酸化酶 a 的转变未能发生，则体内磷酸化酶 b 便可被（假定是被 AMP）激活。

（2）所以，在 I 系小鼠肌肉收缩后几秒钟内，必然会发生 AMP 和（或）P_i的显著增加。

刺激持续的时间（秒）	G6P 的增加（μ/M/g）		乳酸的增加（μ/M/g）	
	C_{57}	1	C_{57}	1
0.5	0.04	0.0		
1.0	0.06	0.0		
2.0	0.10	0.0	0.5	0.2
4.0	0.15	0.04	1.0	0.7
6.0	0.23	0.06	3.1	1.1
8.0	0.41	0.07	5.6	1.4
10.0	0.50	0.19	6.0	3.1
12.0	0.52	0.26	6.3	4.0

图4.9　强直刺激以后的正常小鼠（C-57系）和异常小鼠（I系）所形成的 G6P 和乳酸[19]。

（3）I 系小鼠起始糖原分解前的延缓时间，可以代表反应1—3（图4.8）P_i 和 AMP 的浓度升高到可激活磷酸化酶 b 所需要的时间。

（4）在正常小鼠中没有这种时滞，这就有力地支持了这个说法，即在正常骨骼肌中磷酸化酶 a 的出现起始了糖原分解。它证实了体内磷酸化酶 a 被激活所需要的AMP + P_i/ATP + G6P 的比值比磷酸化酶 b 所需要的为低。

I 系小鼠似乎也很正常，例如，游泳的时间能象正常小鼠一样长。对小鼠来说，在实验室条件下立即降解糖原的能力及略快的始动速率，并不特别重要，但在野外情况下，为了捕食和逃避捕食者，必须在这方面具有强的选择性优势才行。

简而言之，对静息和收缩的肌肉中代谢物浓度的测定数值，目前仍未能阐明为什么磷酸化酶 b 在静息肌肉中完全没有活性，或者为什么在体内不同的代谢情况下，磷酸化酶 a 的活性可有50%或50%以上的变化。由于整个肌肉中代谢物

浓度是个很粗略的平均值，以致在某些情况下必然会妨碍对在浓度方面有明显变化的代谢物的测定。这对各种细胞内组份中存在的象 ATP、AMP 和P_i 这些代谢物来说，很可能确实如此[22]。另一方面，测定局限在肌浆中的糖原、G6P 和乳酸这些代谢物，对于研究体内糖原分解的控制是有价值的。

4.6 磷酸化酶磷酸酶的调节

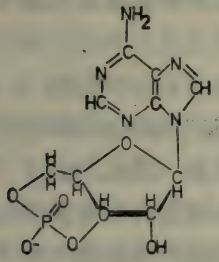
磷酸化酶磷酸酶可被 AMP 抑制（$K_i<0.01mM$），在体外也可被 P_i 抑制[27]，因而这些抑制剂在决定体内磷酸化酶 a 稳定态水平方面也起到一定的作用。然而，分析体内磷酸化酶磷酸酶的调节，在技术上是非常困难的，还未曾做过探讨。已经完成的几个实验指出，当撤除电刺激或激素刺激后，几秒钟内磷酸化酶 a 就可以重新转变成磷酸化酶 b[20]。乳酸的形成也相应地下降，这就再次说明，在决定肌肉收缩时的糖原分解的速率方面，磷酸化酶 a 起着重要的作用。

AMP的抑制作用是由于AMP与磷酸化酶 a 结合引起的，而不是由于与磷酸化酶磷酸酶结合引起的[27]。这是一种在以往的这类研究中未碰到过的调节方式，在这里变构效应物通过改变底物的构象而抑制了酶。所以 AMP 不仅直接激活了磷酸化酶，而且也影响了磷酸化酶 a 稳定状态的水平。这类调节可见于许多靠可逆的共价改变而被调节的酶，并且这类调节主要优点在于，它能在两个不同的水平上发挥调节作用，而致扩大任何调节性代谢物的效应。不过磷酸化酶激酶的活性不受 AMP 的影响。

4.7 激素对糖原分解的控制

4.7.1 环腺苷酸的发现[4]

尽管早在本世纪20年代就已证明，肾上腺素对肝脏和肌



$ATP \longrightarrow$ 环3′,5′-AMP $+ PP_i$　　(1)

环3′,5′AMP $\longrightarrow$ 5′-AMP　　(2)

图4.10　cAMP的结构及其形成和破坏反应。酶：〔1〕腺苷酸环化酶；〔2〕cAMP磷酸二酯酶。

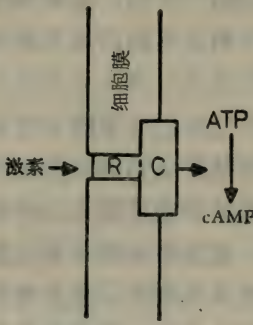


图4.11　膜上的腺苷酸环化酶系统蛋白质组分的假设模型[3]。

肉糖原分解有刺激作用，但直到1950年，对肾上腺素（或其它各种激素）作用机理方面的知识，几乎没有什么进展。原因是除了完整动物以外没有任何系统能证明激素的效应。但是Earl Sutherland 于1950年证明，如果将肝切片与肾上腺素或胰高血糖素共同保温培育，便可以刺激糖原分解，后来又证明，还可增高磷酸化酶的活性。尽管这是第一次得以证明激素能够影响一种专一酶的活性，然而，当把肝切片制成匀

浆后，它仍然失去了对激素的反应。由于发现了磷酸化酶活性变化的化学性质，这才搞清 ATP 和Mg^{++}对激活作用是必需的，并且确实是，当加进这些成份后，就恢复了对激素的敏感性。证明在破碎细胞的制剂中能重现激素刺激的效应，是一个重要的突破，并且承认对激素的这种反应可分成两个阶段。第一阶段，激素作用于膜的部份，产生一个小的耐热因子；第二阶段，这个因子可代替激素并提高磷酸化酶 a 的比例。

已鉴定这个因子为 cAMP（不要与 AMP 混淆），并表明它是从 ATP 通过与结合在膜上的腺苷酸环化酶的作用而生成的，它可被 cAMP 磷酸二酯酶水解（图4.10）。

关于腺苷酸环化酶系统的假说，以图4.11作图示说明。按照这个理论，激素与位于细胞膜外部表面特殊位置上称为受体的相互作用。受体与位于膜内表面上的腺苷酸环化酶偶联，这样肾上腺素和胰高血糖素结合，就使腺苷酸环化酶激活和细胞内cAMP 的形成增多。所以现行的观点就把受体-腺苷酸环化酶系统和变构酶等同起来，该变构酶至少由两种类型的亚基组成，除了它是一种按固定方向横跨膜而排列的脂蛋白复合体外，颇象天冬氨酸转氨甲酰酶（第二章）。激素是变构的激活剂，受体是调节亚基，腺苷酸环化酶则是催化亚基。

目前这一模型（特别是在肌肉方面）的证据只是间接的。可以从肝和其它组织（其中腺苷酸环化酶可迅速对激素产生反应）得到浆膜制剂，这就表明，与激素结合的部位存在于这些靶细胞的外部膜上。利用完整的鸟红细胞所做的三个实验，取得了支持前面所提出的复合体在膜中方向的最有力的证据[4]：

（1）将 ATP 加入悬浮有细胞的培养基中，细胞便不

能从 ATP 形成 cAMP。

（2）在肾上腺素的作用下，cAMP 是在细胞内形成，而不是在细胞外形成的。

（3）在完整的细胞中，腺苷酸环化酶的活性不会被胰蛋白酶破坏，但当细胞被溶解后，酶活性便迅速被破坏。

尽管人们觉得受体和腺苷酸环化酶是各不相同的蛋白质，但试图证明这种看法的尝试都失败了，因为用去污剂将膜上的腺苷酸环化酶溶解出来时，常常破坏了酶对激素的敏感性。新近认为：某些磷脂可以恢复已被溶解了的、不含去污剂的心肌腺苷酸环化酶制剂对胰高血糖素的反应性[35a]，并且也提出了证据，证明在这组织中的主要胰高血糖素结合部份，可以从腺苷酸环化酶分离出来。然而并没有进行一些关键性的实验，这些实验涉及，重新加入胰高血糖素结合蛋白质，可抑制腺苷酸环化酶，而重新加入激素，则随之就发生无活性的复合体被重新激活。只有完成了这种实验，才能证明胰高血糖素结合蛋白质并不是受体，很清楚，利用这种结合的研究来鉴定受体，亦是不可靠的[35b]。

胰高血糖素不影响骨骼肌糖原分解这一点，可用这个十分简单的理论来解释；即不是因为缺乏胰高血糖素的受体，就是因为在这个组织中没有腺苷酸环化酶偶联。在肝细胞或脂肪细胞中，有两种以上不同的激素，都能刺激腺苷酸环化酶，其效应并不是相加的，这暗示每种激素可激活相同的腺苷酸环化酶[4]。

4.7.2 糖原分解中 cAMP 的作用

虽然cAMP 是在研究肝脏中糖原分解的激素控制过程中被发现的，可是它的作用机理却完全是靠 Edwin Krebs 及其同事们作了关于骨骼肌的系统分析后才得以解释的[16]。

已发现部份纯化的肌肉磷酸化酶激酶，在pH6.8时（接近生理性 pH）的活性比在pH8.2时的低得多。事先与 Mg^{++}-ATP 保温培育，就可以使酶从活性很弱的 b 型转变成激活的a型，它在 pH6.8 时具有 25—50 倍以上的活力，而在 pH8.2时，活性只略有增加。加入cAMP 可激发而转变成 a 型（图4.12）。

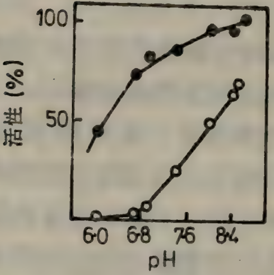


图4.12　肌肉磷酸化酶激酶与 Mg^{++}-ATP和cAMP 保温培育前（○）和保温培育后（●）的pH-活性曲线。全部测定均在饱和 Ca^{++} 的情况下进行的[16]。

应用分离出高纯度的磷酸化酶激酶，就显而易见蛋白质发生了磷酸化，而且cAMP 可以刺激这个反应。其后又进行了关键性的观察，发现在刺激活性达到最大的浓度时[29]，并未见到cAMP和磷酸化酶激酶结合。这意味着cAMP 的影响可能仅仅是间接的，并暗示了还存在着另一种酶（磷酸化酶激酶激酶），它能将磷酸化酶激酶 b 转变为磷酸化酶激酶 a 。

磷酸化酶激酶激酶被命名为依赖cAMP 的蛋白质激酶（cAMP-PrK），因为现在已知此酶的专一性要比最初那个名称表示的专一性更广一些（4.10节）。这个酶是由与 cAMP 结合的调节亚基（R）和带有活性部位的催化亚基（C）组成的。cAMP 的激活作用，可相应发生 R_2C_2 复合体[28]的解离，尽管还不知道这种解离是否先于激活作用。

$$R_2C_2 + 2cAMP \longrightarrow (cAMP)_2R_2 + 2C$$

无活性(b)　　　　　　　　　有活性(a)

由于发现了cAMP-PrK，于是提出肾上腺素可通过图4.13所示的途径刺激糖原分解。这个假设为下列证据所支持。当肾上腺素缺乏时，体内磷酸化酶激酶具有较低的pH6.8/8.2活性比，这是脱磷酸化的b型的特点。静脉内注射肾上腺素，30秒内就使cAMP水平增加3—4倍，磷酸化酶激酶的pH6.8/8.2活性比突然上升，并且升高了磷酸化酶a的水平[31-33]。此外，体外实验时，磷酸化酶激酶的激活可相应产生同一部位的磷酸化作用（被cAMP-PrK磷酸化）[34]。

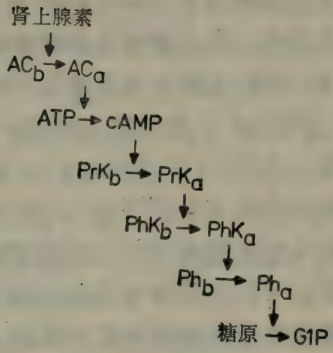


图 4.13 肾上腺素对肌肉糖原分解的刺激。AC——腺苷酸环化酶；cAMP——环腺苷酸；PrK——依赖环腺苷酸的蛋白质激酶；PhK——磷酸化酶激酶；Ph——磷酸化酶；b——无活性或活性很低的形式；a——激活型。图中略去了磷酸化酶磷酸酶，磷酸化酶激酶磷酸酶和环核苷酸磷酸二酯酶等。

骨骼肌中有一种蛋白质，它可通过与酶的催化亚基结合而专一性地抑制cAMP-PrK[35]。这种抑制剂蛋白质的功能，可能是在缺乏肾上腺素条件下使任何cAMP-PrK的活性失活[28c]，并且还可解释为什么在缺乏激素时磷酸化酶激酶几乎全是b型[34]。抑制剂的存在应该产生阈效应（表示cAMP-PrK的活性对cAMP水平的很小变化都非常敏感）。认为这个抑制剂所起的作用与胰脏的胰蛋白酶抑制剂的作用相类似（第三章）。

磷酸化酶激酶是单个酶中同时具备糖原分解的神经性和激素性控制（通过 Ca^{++} 和磷酸化作用）的关键。在缺乏肾上腺素的情况下，当肌肉受到强直刺激时，cAMP 的水平并无变化，而且磷酸化酶激酶仍保持 b 型[31, 32]。在这些情况下，磷酸化酶 b 只有通过 Ca^{++} 的介导才能迅速转变为 a 型（图4.6）。给予肾上腺素，可促使磷酸化酶激酶向 a 型转化，在有 Ca^{++} 存在时，a 型的活性是 b 型的 50倍，但是仍绝对需要有 Ca^{++}[15c]。不过有一些证据证明 a 型Ca^{++}的K_s比 b 型的要低[21]。无论怎样，强直收缩和给予大剂量肾上腺素可以说是两种不同的极端，在正常生理条件下，磷酸化酶激酶活性的调节似乎取决于 cAMP 和 Ca^{++} 极微小的变小，而并不是取决于 cAMP 或者 Ca^{++}在某一方面发生的（通过实验可以产生的）大幅度的变化[4]。

4.7.3 依赖 cAMP 的蛋白质激酶对磷酸化酶激酶的控制[15c,34,36]

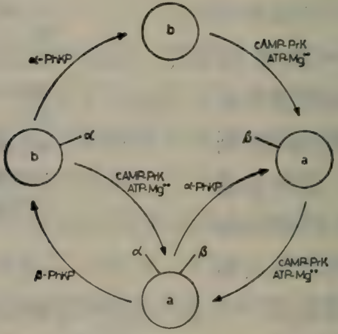


图4.14　通过多部位磷酸化作用对磷酸化酶激酶产生的激素性控制[36]。PhKP——磷酸化酶激酶磷酸酶；α、β——磷酸化的 α-和β- 亚基。其它符号与图4.13同。

磷酸化酶激酶由α、β、γ3个亚基组成，它的结构是$(\alpha\beta\gamma)_4$。cAMP-PrK 对它的调节作用比图 4.13中所示的更为复杂，图4.14概括了新近的看法。磷酸化作用发生在两个不同的残基上，先是β-亚基的快速磷酸化作用，其后为α-亚基的缓慢磷酸化作用，活性的变化与β-亚基的可逆性磷酸化作用有关。α-亚基的磷酸化作用不直接影响酶活性，但可以大大增强β-亚基脱磷酸化的能力。下列发现指出了体内这个机理的重要性：即如果给予肾上腺素，那么体内α-和β-亚基都可以被迅速磷酸化；并且在骨骼肌中存在着两种不同的分别催化α和β亚基脱磷酸化作用的酶。

这些实验使人们认为cAMP-PrK具有双重作用。它可通过始动β-亚基的磷酸化作用来激活此酶，并且可通过α-亚基的继发的磷酸化作用，来决定开始失活的时间。这些反应的不同速率就创建了一个短暂的时期，在这个时期cAMP-PrK 和β-磷酸化酶激酶磷酸酶将不竞争，这就延迟了磷酸化酶激酶的激活，促进磷酸化酶b转变成a。磷酸化酶激酶的失活速率将取决于 cAMP-PrK 和具有相反功能的两种磷酸酶的相对活性。β-磷酸化酶激酶磷酸酶可逆转激素性的激活作用，而α-磷酸化酶激酶磷酸酶则可抑制失活作用的速率。所以这两种磷酸酶可能是处于控制的相互对立的形式，不过这些控制的性质是什么还未搞清。尽管对这个系统还不十分了解，但是可以看出具有两点普遍意义，第一，在体内存在着通过多部位磷酸化作用的酶调节作用，并且可能是一个没有例外的规律[37]。继发性磷酸化作用能大大提高酶的调节潜力，这不仅是由于它以不同于初始磷酸化作用的方式影响了酶的动力学参数，而且也由于允许进一步相互转变的酶进入使它们本身可能处于单独控制之下的系统。第二，存在着一种终止激素刺激反应的机理，这些机理与起动这些反

应的机理一样，令人迷惑不解。

4.8 糖原合成的调节

自本世纪三十年代发现磷酸化酶起，直到1957年，一直认为磷酸化酶不但能催化糖原分解，而且还能催化糖原合成，因为未曾发现其它的合成途径。然而令人费解的是，在体内磷酸化酶 a 的形成常常是伴随着糖原分解，而从不伴随糖原的合成。UDPG[3] 和另一个合成途径的发现（图4.1），澄清了这个问题，后来，由于发现完全缺乏磷酸化酶活性的病人（McArdles 疾病）糖原水平有所提高，这才确立了磷酸化酶在生理学上的重要性。

J. Larner和他的同事们证明，糖原合成酶（糖原合成中的限速酶）是受磷酸化-脱磷酸化作用机理调节的。磷酸化的 b 型活性很低，但能被变构效应物 G6P 完全激活。而脱磷酸化的 a 型，不需 G6P 就几乎具有充分的活性[38]。

G6P 对 b 型的激活，可被 ATP 和 P_i 所拮抗，a 型也受到 ATP 的强烈抑制，但低浓度的 G6P 就可逆转这种抑制作用。所以，磷酸化-脱磷酸化作用就在两种类型之间（这两种类型的酶对变构效应物 G6P、ATP和 P_i 的敏感性各不相同）相互转化糖原合成酶[39]。然而，据认为在代谢物浓度下，静息肌肉中 b 型几乎都无活性，而 a 型则几乎具有完全的活性。

已表明在体外糖原合成酶 a 转变成 b 是受 cAMP 刺激的，并且由于发现了 cAMP-PrK，这就清楚了这个酶不但能催化磷酸化酶激酶的激活，也能催化糖原合成酶的失活[40]。于是这就提出了在糖原代谢的各种蛋白质磷酸酶之间可能存在同一性问题，并且近来的证据认为，β 磷酸化酶激酶磷酸

酶、糖原合成酶磷酸酶和磷酸化酶磷酸酶可能就是一种酶，并且与称作蛋白磷酸酶的是同一种蛋白质（文献〔41〕；图4.15）。根据这些同一性以及 G6P 和 P_i 对糖原合成酶和磷酸化酶活性具有相反的影响而提出，当起始糖原分解时，糖原合成就可能被阻，反之也一样。然而，糖原合成酶的活性不受AMP或 Ca^{++}的影响，磷酸化酶激酶不催化糖原合成酶 a 向 b 的转化，而且对完整肌肉进行的研究表明情况更为复杂。

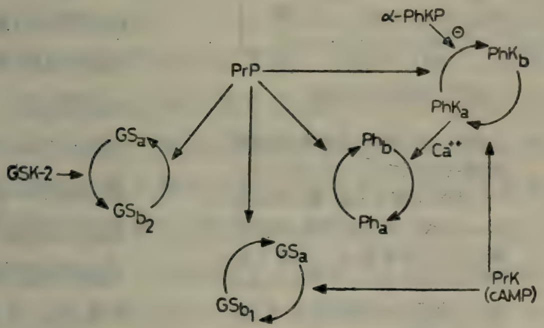


图4.15　蛋白质激酶和糖原代谢蛋白质磷酸酶之间的相互关系。GS——糖原合成酶；PrP——蛋白质磷酸酶。其它缩写符号与图4.13、4.14相同[41]。

尽管磷酸化酶和磷酸化酶激酶完全被脱磷酸化了，但静息肌肉中的糖原合成酶的主要形式具有磷酸化 b 型的动力学特性[18,42]。当使肌肉作短暂的强直收缩时，一秒钟内磷酸化酶就会向 a 型转变，糖原水平下降，但并不发生进一步向糖原合成酶 b 的转变（图4.16）。反之，合成酶 b 的比例开始下降。当强直刺激一停止，几秒钟内磷酸化酶 a 就会重新转变成 b，不过向合成酶 a 的转变持续 5 分钟。然后接着在30—60分钟内发生合成酶 a 重新转变成 b，糖原含量逐渐增加，合成酶 b 和糖原终于恢复到肌肉静息时的水平。整个恢

复时期磷酸化酶和磷酸化酶激酶完全保持脱磷酸化的 b 型。

这些观察清楚地表明，当肌肉收缩和松弛时，磷酸化酶 b 和 a 及合成酶 b 和 a 的相互转化，不是以同样的速度或在同一个时期发生的。其原因可能有两个。

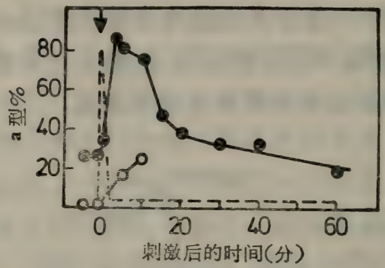


图4.16 小鼠肌肉中糖原合成酶和磷酸化酶的相互转变[18,32,49]。---磷酸化酶 a；●-●-合成酶 a；○-○-事先以肾上腺素处理之后的合成酶 a。a 和 b 型的比例是根据∓G6P(合成酶)和∓AMP（磷酸化酶）的活性比确定的。

第一个原因是由于新近发现的第二个称作GSK-2的糖原合成酶激酶与cAMP-PrK 不同，它可将糖原合成酶a转变成b。GSK-2不会被cAMP 所激活或被抑制剂蛋白质所抑制。它磷酸化的部位与cAMP-PrK 标记的部位不同，并可产生一个具有不同的 G6P的 *K*a 的糖原合成酶的形式[43]。由cAMP-PrK 和 GSK-2 产生的两种形式，分别称作 b_1 和 b_2（文献〔43〕；图4.15）。GSK-2的存在似乎可以解释为什么在缺乏磷酸化酶或磷酸化酶激酶的磷酸化作用时，静息肌肉中糖原合成酶 a 能够转变成 b （图4.16）。

第二个原因是与蛋白质磷酸酶活性的调节有关。虽然似乎所有使糖原分解失活和激活糖原合成的脱磷酸化作用都是由单个酶来完成，但是通过每种底物构象的选择性改变，仍然有独立调节每种活性的充分机会。因此磷酸化酶磷酸酶可通过 AMP与磷酸化酶 a 结合而被抑制(4.6节)，β-磷酸化酶激酶磷酸酶可通过磷酸化酶激酶的 α-亚基的磷酸化作用而

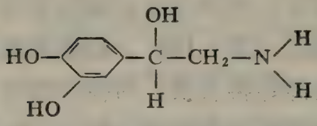
被激活（4.7.3节），而糖原合成酶磷酸酶则通过糖原与糖原合成酶的结合而被抑制[39,43]。最后述及的那个作用可能是一个反馈控制，通过这一控制，糖原就能确定糖原合成酶活性的水平（图4.16）。另一方面，直接与蛋白质磷酸酶相互作用的代谢物，可能同时影响所有的酶活性。目前许多实验室都在紧张地研究，以探索这些因素。多功能性蛋白质磷酸化酶显然能适合各种活性的独立的以及同步的调节。

肌肉强直收缩时糖原分解的速率比静息肌肉中糖原合成的速率要快好几百倍[25]，这就可以解释为什么在这里糖原合成酶的同步抑制就不那么重要了（图4.16）。当肌肉收缩终止后，用这种方式保证糖原迅速地再合成，对控制糖原合成酶可能更为重要。糖原分解和糖原合成的同步控制，比肌肉强直收缩时糖原分解略有加速的情况似乎是更重要，因为在这种情况下与糖原合成的竞争就可能变得有一定的意义了。在静息肌肉中，当存在肾上腺素时，可以发生这种情况（4.5节）。在这些情况下发生的糖原合成酶同步抑制（图4.16），应防止糖原合成受到肾上腺素对糖原分解的适度刺激的干扰。尽管这一点尚未得到证实，但可以预言，肾上腺素引起的失活，是通过cAMP-PrK催化的磷酸化作用加上GSK-2催化的磷酸化作用所介导的。

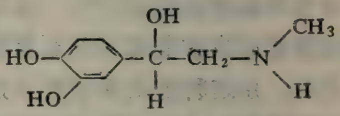
4.9 肝脏糖原代谢的激素性控制；α-和β-肾上腺素能受体

根据经典的药理学理论，已知对于肾上腺素的反应可分成两大类：α 效应和β 效应。典型的α-肾上腺素能效应有血管收缩或眼睛瞳孔放大，而典型的β-肾上腺素能效应，则为血管舒张和心率加快。从交感神经末梢释放出来的去甲肾上腺

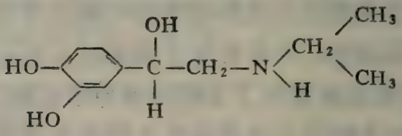
素，是引起α-肾上腺素能效应最为有效，而对产生β-肾上腺素能效应最无效的儿茶酚胺。儿茶酚胺的类似物异丙基肾上腺素（图4.17），在刺激β-肾上腺素能反应中最有效，而在诱导α-肾上腺素能反应中最无效。肾上腺素本身能中度地引起这两种效应。激活腺苷酸环化酶的，只表现出β-肾上腺素能效应。α-肾上腺素能效应不仅不引起腺苷酸环化酶的激活作用，而且在许多情况下使得 cAMP 水平降低[4]。



去甲肾上腺素



肾上腺素



异丙基肾上腺素

图4.17 一些儿茶酚胺的结构。

尽管 cAMP是在研究肾上腺素和胰高血糖素对肝脏糖原分解的影响时被发现的，但近来通过对灌流大鼠肝脏系统的研究认为，肾上腺素和去甲肾上腺素刺激糖原分解和糖原异生的作用，至少部份地是由于 α-肾上腺素能的效应（而这个效应并不涉及 cAMP 水平的改变）[28d]。尽管它伴随有磷酸化酶 a 和糖原合成酶 b 的比例增加，但肾上腺素能效应的机理仍不清楚。去甲肾上腺素的作用和肾上腺素的作用相等，肝脏糖原分解的这种神经性控制，在生理学上似乎是最重要的。正常循环的肾上腺素水平（0.001—0.01μM）对肝

脏糖原分解几乎没有影响，并且肾上腺素的作用可能仅限于肌肉方面[44]。

尽管胰高血糖素对肝脏糖原分解的刺激作用可能是通过cAMP 来完成的，但图4.13中给出的作用机理仍未被确认。无论是在体内或在体外， cAMP-PrK 对肝脏磷酸化酶激酶的激活作用都未能证实，并且通过 cAMP 形成磷酸化酶 a 还存在着另外的机理（磷酸化酶磷酸酶的抑制作用？）。胰岛素可降低先前被胰高血糖素提高了的 cAMP 水平，这至少可能成为该激素刺激肝脏糖原合成的部份基础（再参见4.11节）。

虽然胰高血糖素与胰岛素的比例和儿茶酚胺的存在，在血液葡萄糖水平的调节中都是关键因素，但葡萄糖本身可能也是一个重要的反馈调节剂。肝细胞与肌肉细胞不同，它能让葡萄糖自由渗透，因而葡萄糖是磷酸化酶磷酸酶和糖原合成酶磷酸酶的激活剂。葡萄糖（还有胰高血糖素）可刺激胰脏 β 细胞释放胰岛素，而类固醇激素（如糖皮质激素）还刺激糖原沉积[45]。尽管发现了 cAMP，但肝脏糖代谢的控制在分子水平上的过程，仍是复杂而又缺乏了解的。

4.10 激素作用的分子基础

现已证明，很多激素都能在体内影响腺苷酸环化酶的活性及 cAMP 的水平[4]，这就使人们对 cAMP 作为一般激素作用的介体的作用发生了广泛的兴趣。因为 cAMP-PrK 在脊椎动物组织中是仅有的能以高度亲和力与 cAMP 结合的蛋白质（除 cAMP 磷酸二酯酶以外），因此人们推测cAMP的很多效应或所有效应都是通过这个酶（cAMP-PrK）介导的。在各种组织中，甚至在糖原代谢重要性较小的组织中，

这个酶的活性都非常相似，这一点支持了那种认为 cAMP-PrK 作用比较广泛的意见[35]。图4.18表示的是激素通过 cAMP 而发生作用的假设机理[16]。这个假设的优点在于，被蛋白质磷酸化作用所始动的变构转变，能以各种方式影响生物学功能，这就为很多激素各式各样的作用，作了简单而统一的解释。

如果这个理论是正确的，那么在膜运送和分泌过程中、在肌肉收缩和蛋白质合成中以及在中间代谢中的许多蛋白质，必定是 cAMP-PrK 的细胞内底物。下面列出蛋白质能被确定为 cAMP-PrK 的生理性底物所必须具备的四个基本条件[35]：

激素
↓
cAMP的产生
↓
蛋白质激酶激活
↓
磷酸化蛋白质（修饰了的功能）
↓
生理学变化

图4.18 关于通过 cAMP 的作用对细胞功能的激素调节的假设[16]。

（1）在体外，cAMP-PrK 应能催化依赖于时间的蛋白质活性的改变。

（2）活性的改变应伴随有蛋白质的磷酸化作用，并且可被蛋白质磷酸酶的作用所逆转。

（3）在体内的激素反应中应能发生可逆性蛋白质活性的改变。

（4）在体内的激素反应中，应能发生蛋白质的磷酸化

作用，在体外，于同样部位被 cAMP-PrK 磷酸化。

虽然只有磷酸化酶激酶符合上述四条标准，但目前只有五种酶被认为可能是 cAMP-PrK 的生理性底物(图4.19）。在脂肪组织中，甘油三酯脂酶的激活作用将促进被儿茶酚胺刺激而加速的脂肪酸的生成速率。肾上腺皮质中胆固醇酯酶的激活作用，有助于为 ACTH 刺激而加速的类固醇激素的生成速率。肝脏丙酮酸激酶的失活，可能构成胰高血糖素刺激糖原生成的基础。不过已观察到，在体外随着与 cAMP-PrK 保温培育而发生的或体内给以激素后而发生的甘油三酯脂酶或胆固醇酯酶的激活作用非常之小（大约只有2倍），不易说明是由于激素刺激而增加脂肪酸或类固醇的生成率。此外，还未能得到完全符合标准（2）和（4）的相当纯的酶[46,47]。就丙酮酸激酶而论，也不完全符合标准（3）和（4）[48]。从在肌肉糖原代谢方面的经验来判断，仍包涵着许多意外的情况！

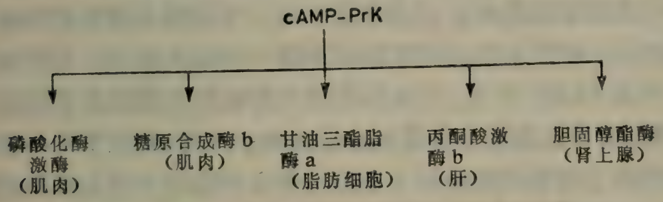


图4.19 在体内，可能是 cAMP-PrK的生理性底物的酶。a——激活作用；b——失活作用。

可能激素的多数作用是影响蛋白质组份不是酶的那些过程，它们包括对肌肉收缩力、分泌作用、膜的运送和渗透性等的影响。尽管蛋白质磷酸化作用可能是这些过程的激素性调节的基础，但由于对这些过程本身的分子特性缺乏了解，从而妨碍了它的进展。

4.11 胰岛素和糖尿病

虽然胰岛素降低肝脏的先为胰高血糖素和儿茶酚胺提高了的 cAMP 水平，并且这可说明若不是全部也大部分是肝脏胰岛素的效应[4]，但还证明，胰岛素不直接对腺苷酸环化酶或 cAMP 磷酸二脂酶制剂作用。所以胰岛素降低肝脏 cAMP 水平的作用，可能是继发于这种激素的原发作用所致。有关这些情况，还得靠骨骼肌方面的大量研究资料来证明。

在缺乏肾上腺素时，胰岛素能刺激肌肉中的葡萄糖摄取及糖原沉积，而 cAMP 也并没有任何明显减少。胰岛素还能提高糖原合成酶 a 的比例，这就说明了胰岛素对糖原合成的刺激作用[38, 42]。根据以前的讨论（4.8节），糖原合成酶 a 水平的提高，可能起因于糖原合成酶磷酸酶活性的提高；起因于某一不涉及 cAMP 降低的机理所引起的 cAMP-PrK 基础活性降低；或是起因于第二个糖原合成酶激酶的抑制作用。还不知道这些可能性中哪一个是正确的，但是如果不涉及 cAMP 的话，那么似乎需要假设存在着胰岛素的第二信使，因为就象肾上腺素和胰高血糖素一样，它似乎是与靶细胞外膜上的特殊受体相互作用，并且可能并不进入代谢活性为它所调节的那些细胞的内部。西欧和北美的人民中约有2%（约一千万人口）患有糖尿病，该病的特点是失去了胰岛素降低血糖水平的能力。尽管患者可由于胰脏 β 细胞功能的一些障碍而使血液循环中常常缺乏胰岛素，但多数病例的胰岛素水平是正常的，或高于正常值。这些病例或者是由于胰岛素不能与它的受体相互作用，或者是由于细胞内胰岛素影响中间代谢的机理存在缺陷。不过很多与这一疾病有关的代谢性

障碍，可能就是由于 cAMP 过量产生而引起的结果，例如因甘油三酯脂肪的过度动员而产生的酮酸毒症[4]。

4.12 摘　要

磷酸化酶、磷酸化酶激酶和糖原合成酶是值得注意的一组酶，这些酶说明它们相互之间在酶调节方面的很多复杂性。虽然这些酶是表明可逆的磷酸化作用进行调节的头三个酶，但是以这种方式来控制的酶的数目正在迅速增多。线粒体丙酮酸脱氢酶就是一个很有代表性的例子[27b]，近来又增加了两个肝脏酶：脂肪酸合成酶[50]和磷酸果糖激酶，它们也都是 aAMP-PrK 的底物（图4.19）。

通过可逆的共价修饰（如磷酸化作用）对酶活性的控制，可具有多种功能：

（a）它能改变酶的动力学特性和变构特性。

（b）它必然要把两个互变酶引入它们本身就要受到控制机理支配的一种系统。因为任何一个蛋白质的表面积都是有限的，因此不可能把所需要的某种酶（它在代谢中占有重要位置）的控制都集中到一个分子里。

（c）能够通过多部位磷酸化作用或通过序列连结两种或多种磷酸化-脱磷酸化作用而进一步增加酶调节的可能性。这后一种现象本身就具有好几种作用。第一，按照与凝血作用相类似的方式，这一系列的反应可以将起始刺激（肾上腺素）的微小变化加以放大（第三章）。第二，如果序列中两种或多种酶分别被同样的变构效应物调节，那么就达到进一步放大的作用（见第五章）。第三，以浓度差别很大而存在的各种酶的键合，能使序列中的终端酶被浓度相差很大的各种代谢物所调节。因此，磷酸化酶（平均细胞内浓度为

0.1mM)不可能直接为 cAMP (0.001mM) 激活。

(d) 磷酸化作用是对来自细胞外部的刺激而使细胞内部代谢过程发生效应的附加作用。

就象限制性蛋白水解那样，由于磷酸化作用共价修饰酶的结构，所以在通过使相互转化的两种酶失活的情况下，从组织中将酶抽提出来，就可能测定体内酶的磷酸化作用程度。在既缺乏共价修饰又缺乏对变构效应物改变了敏感性的突变型酶时，根据对分离的酶进行研究所提出的控制机理来确定对完整细胞是否重要，则是很困难的。

哺乳动物代谢的极端复杂性，使第二章讨论的变构调节的一般原理变得模糊了。虽然可以把 ATP 当作糖原分解的终产物，但是 Ca^{++}离子、cAMP 和 AMP 却发挥着许多重要的控制作用。G6P 对糖原合成酶的激活，可以看作是“前馈”激活（其中代谢途径中先产生的代谢物，对该代谢途径需要增加活性的下一个酶发出信号）。

关于激素作用的分子学基础的研究仍处于“幼年”阶段，它是代谢控制研究的主要课题。胰岛素作用的分子学基础，可能是有关糖类代谢的激素调节中尚未解决的主要问题。有关类固醇激素在代谢中的作用，将在本丛书另一册中讨论[51]。

参 考 文 献

〔1〕Cori, G. T., Colowick, S. P. and Cori, C. F. (1938), *J. Biol. Chem.*, 123, 381-389.

〔2〕Krebs, E.G. and Fischer, E.H. (1956), *Biochim. Biophys. Acta.*, 20, 150-157.

〔3〕Leloir, L. F, and Cardini, C. E. (1957), *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 6340-6341.

〔4〕Robison, G. A., Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. (1971), *Cyclic AMP*, Academic Press, New York and

London.
〔5〕Cori,C.F.(1931), *Physiological Reviews*, 11, 143-275.
〔6〕Fischer, E.H., Heilmeyer, L. M. G. and Haschke, R. H. (1971),*Curr.Tops.Cell.Reg.*, 4, 211-251.
〔7〕Cori, G.T. and Green, A.A.(1945), *J. Biol. Chem.*, 151, 31-38.
〔8〕Titani, K., Cohen, P., Walsh, K. A. and Neurath, H. (1975),*FEBS Letters*, 55, 120-123.
〔9〕Birkett, D.J., Radda, G. K. and Salmon,. A. G. (1970), *FEBS Letters*, 11, 295-297.
〔10〕Helmreich, E. and Cori, C. F. (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51, 131-135.
〔11〕Morgan, H. E. and Parmeggiani, A.(1964), *J.Biol.Chem.*, 239, 2440-2445.
〔12〕Lowry, O.H., Schultz, D.W. and Passoneau, J.V.(1964), *J.Biol. Chem.*, 2,39,1947-1953.
〔13〕Ebashi, S., Endo, M. and Ohtsuki, I.(1969), *Quart. Rev. Biophys.*, 2351-2384.
〔14〕Harrington, W. F.(1972), In *Current Topics in Biochemistry*, pp. 135-185, Academic Press, New York and London.
〔15〕Biochem. Soc. Symp(1974), *Calcium and Cell Regulation*, 39,(a)Perry,S.V. 115-132;
(b)Ashley, C.C. and Caldwell, P.C., 29-50;
(c)Cohen,P. 51-73.
〔16〕Krebs, E.G. (1972), *Curr.Tops. Cell. Reg.*, 5, 99-133.
〔17〕Danforth, W.H. and Helmreich, E.(1964), *J. Biol. Chem.* 239, 3133-3138.
〔18〕Danforth, W.H. and Lyon,J B. (1964), *J. Biol. Chem.*, 239, 4047-4050.
〔19〕Helmreich, F. and Cori, C.F. (1966),*Adv. Enzyme Reg.*, 3, 91-107.
〔20〕Danforth, W. H., Helmreich, E. and Cori, C. F. (1962), *Proc.Nat. Acad.Sci.*, 48, 1191-1199.
〔21〕Brostrom,C.O., Hunkeler, F. L. and Krebs, E.G.,(1971)*J. Biol. Chem*, 246, 1961—1967.
〔22〕Denton, D.and Pogson, C., (1976), *Metabolic Regulation*, Chapman and Hall, London.
〔23〕Marquez-Julio, A. and French, I. W. (1967), *Can. J.Biochem.*, 45, 1323-1327.
〔24〕Wilson, J.E., Sacktor, B.and Tiekert, C.G. (1967), *Arch.*

Biochem. Biophys., 120, 542-546.
〔25〕 Piras, R. and Staneloni, R.(1969), *Biochemistry*, 8,2153-2160.
〔26〕 Karpatkin, S., Helmreich, E.and Cori, C.F.(1964),*J.Biol. Chem.*, 239, 3139-3145.
〔27〕 *Metabolic. Interconversions of Enzymes* 1973, (1974), Springer-Verlag, Heidelberg;
(a)Gratecos,D.,Detwiler, T., and Fischer, E.H. 43-52;(b) Reed, L. J., Pettit, F.H., Roche, T.E., Butterworth, P. J., Barrera, C.R., and Tsai, C.S., 99-106.
〔28〕 *Advances in Cyclic Nucleotide Research* (1975), 5:(a) Levey, G.S., Fletcher, M. A. and Klein, I. 53-65; (b) Cuatracasas, P.79-104; (c) Beavo, J.A., Bechtel, P. J.and Krebs, E.G. 241-251;(d)Exton,J.H.and Harper,S.C.519-530.
〔29〕 Delange, R.J., Kemp, R.G., Riley, W.D., Cooper, R.A. and Krebs, E.G.(1968).*J.Biol. Chem.*, 243, 2200-2208.
〔30〕 Walsh, D.A., Perkins, J.P., Ho,E. S. and Krebs, E. G. (1971),*J.Biol. Chem.*, 246, 1968-1976.
〔31〕 Posner, J.B., Stern, R. and Krebs, E.G. (1965), *J. Biol. Chem.*, 240 982-985.
〔32〕 Drummond,G.I.,Harwood,J. P.and Powell, C. A. (1969), *J. Biol.Chem.*, 244,4235-4240.
〔33〕 Mayer, S.E. and Stull, J.T.(1971),*Ann.N. Y. Acad. Sci.*, 185,433-448.
〔34〕 Yeaman, S.J.and Cohen, P.(1975),*Eur.J. Biochem.*,51, 93-104.
〔35〕 Walsh,D.A.and Ashby, C.D.(1973),*Rec.Prog. Horm.Res.*, 29, 329-359.
〔36〕 Antoniw,J.F.and Cohen,P.(1976), *Biochem. Soc.Trans.*, 3, 83-84.
〔37〕 Cohen, P.(1976), *Trends in Biochemical Sciences*,1,38-40.
〔38〕 Larner, J., Villar-Palasi, C., Goldberg, N.D., Bishop, J.S., Huijing, F., Wenger, J.I., Sasko, H. and Brown, N. D. (1968),*Adv.Enz.Reg.*,6, 409-423.
〔39〕 Piras, R., Rothman,L.B.and Cabib, E.(1968),*Biochemistry*, 7,56-66.
〔40〕 Soderling, T. R., Hickinbottom, J. P., Reimann, E. M., Hunkeler, F.L., Walsh, D. A. and Krebs, E. G.(1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 6617-6628.
〔41〕 Cohen, P.,Antoniw, J.F., Nimmo, H. G. and Proud, C.G. (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, 3, 849-854.

〔42〕 Danforth, W. H. (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 588-593.
〔43〕 Nimmo, H. G., Proud, C.G. and Cohen, P.(1976), *Eur. J. Biochem.*, *in press*.
〔44〕 Sokal, J.E., Sarcione, E. J. and Henderson, A. M. (1964), *Endocrinology*, 74, 930-938.
〔45〕 Hers, H. G., Stalmans, W., De Wulf, H., Laloux, M. and Hue, L. (1974), In *Metabolic Interconversions of Enzymes 1973*, 89-98, Springer-Verlag, Heidelberg.
〔46〕 Huttenen, J. K., Steinberg, D. and Meyer, S.E. (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 67, 290-295.
〔47〕 Trzeciak, W. H. and Boyd, G.S. (1974), *Eur. J. Biochem.*, 46, 201-207.
〔48〕 Ljungstrom, O., Hjelmquist, G. and Engstrom, L.(1974), *Biochem. Biophys. Acta.*, 358, 289-298.
〔49〕 Qureshi, A. A., Jenik, R. A., Kim, M., Lornitzo, F. A. and Porter, J. W. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 344-351.
〔50〕 Brand, I. A. and Soling, H. D. (1975), *FEBS Letters*, 57, 163-168.
〔51〕 Malkinson, A. M. (1975), *Hormone Action*, Chapman and Hall, London.

第五章　限制性蛋白水解或磷酸化作用以外的共价修饰对酶活性的控制

5.1　大肠杆菌谷氨酰胺合成酶活性的调节

5.1.1　反馈抑制作用

谷氨酰胺在微生物的氮代谢中甚为重要，因为它的酰胺基（并非其氨）是合成色氨酸、AMP、CTP、氨基葡糖-6-磷酸、组氨酸和氨甲酰磷酸时较好的氮供体。此外，通过特殊转氨酶的作用，其α-氨基可以作为合成甘氨酸和丙氨酸时的氮源。导致广泛合成种种代谢物的高度分支途径中的第一个酶——谷氨酰胺合成酶，应是代谢控制的最初靶子。不过，由 Earl Stadtman 及其同事们所解释的机理异常复杂，这是完全料想不到的。

大肠杆菌正好具有单一的谷氨酰胺合成酶，已证明在体外这个酶可被 8 种谷氨酰胺的终产物所抑制（图5.1），虽然曾试验了50—60种其它的代谢物，但都没有这种抑制作用[1]。尽管任何一种终产物甚至在饱和浓度时也只能达到部份抑制的作用，但各种抑制剂的作用是可以相加的，以致当全部 8 种终产物都过量存在时，可以观察到近乎完全的抑制作用。对这种被称为**累加的反馈抑制**的现象，可以作三种推理：每种抑制剂都与酶上各自的部位结合；所有的抑制剂能够同时与酶结合，以及任何一种抑制剂的结合并不会改变

其它抑制剂与酶的结合。这些理论已在AMP与色氨酸的例

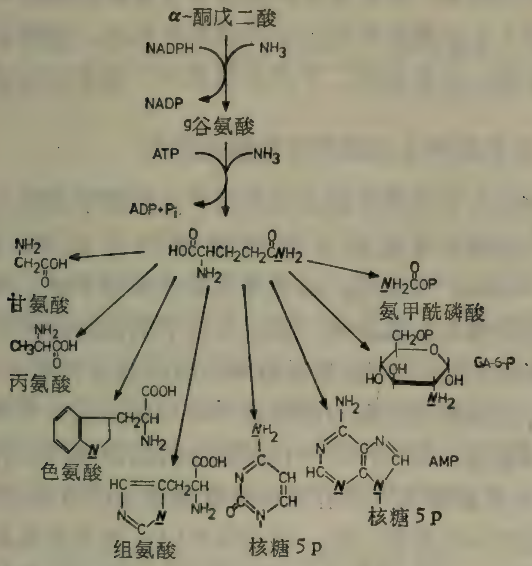


图5.1 谷氨酰胺的代谢命运。来自谷氨酰胺的氮原子，用下面划有短线的斜粗体字表示[2]。（a）谷氨酸脱氢酶；（b）谷氨酰胺合成酶。

子中通过直接结合的研究加以证实[3]，研究表明，谷氨酰胺合成酶能与12个分子的反馈调节剂结合。这点与这个酶是由12个相同的亚基（分子量为50,000道尔顿）组成的结构相一致，这些亚基排列成两个互相叠在一起的六边形（图5.2），从亚基的相对适度大小来看，必然存在很

图5.2 大肠杆菌的谷氨酰胺合成酶的亚基排列方式[2,4]。

多不同的结合部位，这一点是相当明显的。

与天冬氨酸激酶相似（第二章），累加抑制作用（如果它们是有效的话）必然是能通过该分支途径的最终产物继发性控制每个分支途径的第一步反应而补充的。这些已为许多例子所证实，并已在第二章的色氨酸和CTP中讨论过了。

5.1.2 谷氨酰胺合成酶的腺苷酰化作用

本世纪六十年代中期，就有两个实验结果表明，必定还存在另一种调节谷氨酰胺合成酶活性的机理。德国的Helmut Holtzer[5]证明，如果将大肠杆菌置于除了NH_4^+以外的氮源培养基上生长的话，那么细菌中就保持高水平的谷氨酰胺合成酶活性。但是，如果将NH_4^+盐加到培养基中，则在一分钟内谷氨酰胺合成酶的活性就下降10倍，这并非由于酶的合成受到阻遏，因为产生一代细胞的时间需要50分钟。所以NH_4^+必定是促使先它而存在的谷氨酰胺合成酶分子失活。这个效应对NH_4^+是专一的，但在体外NH_4^+离子本身却是一个底物而不是一个抑制剂。为了探索在上述影响中是什么因子在起作用而发现有一种酶，如果补充加入ATP、Mg^{++}和谷氨酰胺，它就能在体外催化谷氨酰胺合成酶失活。于是作这样的假设是合理的，即在耗去α-酮戊二酸和谷氨酸（图5.1）的基础上，NH_4^+促使细胞内谷氨酰胺浓度增加，于是激活这个酶，从而使谷氨酰胺合成酶失活。

在这同时，美国的 Earl Stadtman 也发现，从生长在不同条件下的大肠杆菌分离得到的谷氨酰胺合成酶，不仅酶的专一活性各不相同，而且它们的 Me^{++}专一性及对反馈抑制剂的反应[2,3,6]也不相同。于是他证明了，这些各种不同形式的谷氨酰胺合成酶共价结合腺苷酸(AMP)的量不同。很明显，这两个实验室在研究相同的效应，而且 Holtzer 的

灭活蛋白就是一种腺苷酰转移酶（称作 AT 酶），此酶催化 AMP 与谷氨酰胺合成酶12 个亚基的每一个单独的酪氨酰基共价连接（图5.3）[7,8,9]：

$$\begin{array}{l}\text{脱腺苷酰的谷}\\ \text{氨酰胺合成酶}\end{array}(E_0) + 12ATP \xrightarrow{Mg^{++}} \begin{array}{l}\text{腺苷酰的谷氨}\\ \text{酰胺合成酶}\end{array}(E_{12}) + 12pp_i \qquad (5.1)$$

完全脱腺苷酰的酶(E_0)转化成完全腺苷酰的酶（E_{12}），能将从一个具有活性的、依赖 Mg^{++}的、具有最适 pH 为7.6的谷氨酰胺合成酶转变成活性较低、依赖 Mn^{++}、最适 pH 为6.5的谷氨酰胺合成酶[3]。依赖 Mg^{++}的 E_0 酶对丙氨酸、甘氨酸和 AMP 的抑制作用敏感，而依赖 Mn^{++} 的 E_{12} 酶，却对组氨酸、色氨酸和 CTP 的抑制作用最敏感[6]。

Mg^{++} 和 Mn^{++} 在谷氨酰胺合成酶中的假设功能，就象其它需要 ATP的酶（分别形成Mg^{++}-ATP和 Mn^{++}-ATP 复合

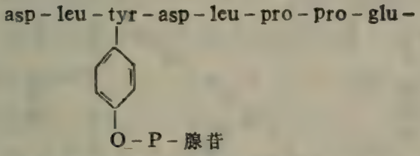


图5.3 谷氨酰胺合成酶腺苷酰作用部位上的氨基酸序列[3]。

物）那样，已被下列情况所证明：为达到最适活性，要求等浓度的 Mn^{++} 和 ATP。因为大肠杆菌在无 Mn^{++} 的合成培养基中也生长得很好，而且细胞内 Mn^{++}的浓度仅在μM的数量级，而Mg^{++}和 ATP 的浓度则在 mM 的数量级，所以看来可能只有与 Mg^{++}结合的活性才具有生理学意义。这就可以把E_0向 E_{12} 的转变看作是对丙氨酸、甘氨酸和 ATP 的抑制作用敏感的有活性的酶转变为无活性的酶。

然而，关于 E_0 向 E_{12} 的转变，仅仅发生于极端的条件下，即在缺 NH_4^+ 的培养基上生长的细胞与富含 NH_4^+ 的培养基接触时。通常谷氨酰胺合成酶存在于腺苷酰作用的中间状态。这就提出了混杂分子（其中只有12个亚基的某几个被腺苷酰化）存在的可能性及其作用的问题。

对于谷氨酰胺合成酶的可能的类型数目方面，不仅要记住每个分子中腺苷酰基的数目，而且还要记住这些腺苷酰基的彼此相关的位置，在两个六面体内它们的类型可有382个！图 5.4 表示具有不同特性的混杂分子确实存在。谷氨酰胺合成酶的特异性与腺苷酰化状态不呈线性函数关系，当酶趋向 E_0 或是趋向 E_{12} 状态时，酶活性便发生较明显的变化。部份腺苷酰化制剂的另外一些动力学参数，以及他们对抗变性的作用，都与 E_0 和 E_{12} 酶的当量混合物有所不同[10,11]。

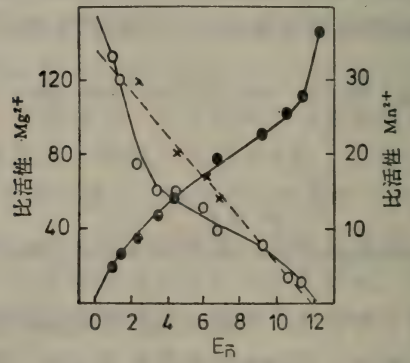


图5.4 腺苷酰化作用状态与谷氨酰胺合成酶比活性之间的相互关系。（○——○）Mg^{++}结合的活性（●——●）Mn^{++}结合的活性；（×——×）以各种比例混合 E_0 和E_{12} 得到的 Mg^{++} 结合的活性[10]。

任何亚基的活性都明显地受到邻近亚基腺苷酰化状态的影响，关于这种情况推测也和对 ATC 酶的假定一样（第二

章），可能是通过传递到亚基接触点的变构性转变而发生的。最初的谷氨酰胺合成酶的制剂（它能显示出对全部8种反馈抑制剂的累加反馈抑制作用，并且也可以显示出对低浓度调节剂的抑制作用比 E_0 和E_{12}的要更敏感）多半是属于部份腺苷酰化的酶[1]。

也有人报道，在磷酸化酶 b 和 a 相互转化过程中，可以形成具有不同性质的部份磷酸化的中间体，于是提出，这种复杂的混杂物可能是一种以共价修饰进行酶调节的普遍现象[12]。

5.1.3 可逆的尿苷酰化作用对腺苷酰化及脱腺苷酰化的控制

将大肠杆菌从富含 NH_4^+ 的培养基中转移到含 NH_4^+ 不足的培养基中时，谷氨酰胺合成酶迅速复活，这证明腺苷酰化作用是可逆的[5]。这就使人们把注意力集中在关于脱腺苷酰化作用的控制问题上，从而得到下面一些值得注意的结果：

（a）脱腺苷酰化作用是通过酪氨酰-O-AMP键的磷酸化裂解进行的[13]。

$$E_{12}(AMP)+12P_i \longrightarrow E_0+12ADP \qquad (5.2)$$

（b）脱腺苷酰化作用需要称为 P_I 和 P_{II} 的这两种不同的蛋白质[14]。

（c）蛋白质 P_I 与 AT 酶是相同的。因此同一种酶既可催化腺苷酰化作用，又可催化脱腺苷酰化作用[15]。

（d）AT 酶（分子量为130,000道尔顿）是由分子量分别为70,000和60,000道尔顿的两个不同的亚基组成的。前者还能催化腺苷酰化作用，但是要证明脱腺苷酰化的活性，则必须用完整的 AT 酶复合物[16,17]。

（e）蛋白质 P_{II} 有两种形式，称作 P_{II}—A 和 P_{II}—D。

当不存在谷氨酰胺和 P_I 时，体外的腺苷酰化活性是很低的。用谷氨酰胺刺激，活性可提高10倍；用 P_I—A 刺激，可提高30倍；而若二者联合使用，则活性可提高40倍。被 P_I—A 激活而产生的腺苷酰化作用，对 α-酮戊二酸的抑制作用非常敏感。P_I—A 不影响脱腺苷酰化作用的速率。P_I—D只是在有谷氨酰胺存在时才可刺激腺苷酰化作用。但是就象需要ATP和α-酮戊二酸一样，脱腺苷酰化作用绝对需要 P_I—D[18]。

（f）P_I—A 向 P_I—D转化，需要 UTP、另一种酶以及 ATP 或α-酮戊二酸。ATP和α-酮戊二酸都存在时，可刺激反应而再提高2—3倍。P_I—D的形成可被谷氨酰胺及 P_i 抑制[19,20]。

（g）蛋白质 P_I（分子量为4,4000道尔顿）是由 4 个相同的、分子量为11,000道尔顿的亚基组成。P_I—A向P_I—D转化，就是在被专一的尿苷酰转移酶(UT酶)催化下[21]，UMP 与存在于每个亚基上的两个酪氨酰残基之一产生共价连接。

$$P_I\text{—A} + 4\text{UTP} \xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{\text{UT酶}} P_I\text{—D(UMP)} + 4\text{pp}_i \qquad (5.3)$$

（h）脱尿苷酰化作用是被尿苷酰迁移酶（UR酶）催化的。这个酶可在有 Mn^{++}离子存在时单独发生作用，也可以在有α-酮戊二酸或是有 ATP 存在时与镁发生作用。当 ATP 和α-酮戊二酸都存在时，可刺激Mg^{++}连接的 UR 酶活性进一步提高 2 倍[22*]。

$$P_I\text{—D(UMP)} + 4H_2O \xrightarrow{\text{UR酶} \cdot \text{Me}^{++}} P_I\text{—A} + 4\text{UMP} \qquad (5.4)$$

所有这些发现的净结果，如图5.5中所示，谷氨酰胺合成酶是被两个相反方向的级联系统调节的。

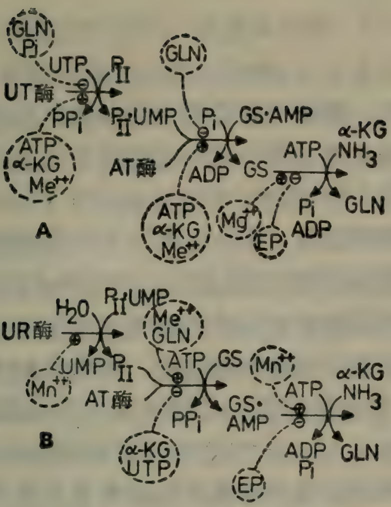


图5.5 谷氨酰胺合成酶(GS)的级联控制。A——GS的活化（脱腺苷酰化作用）；B——GS的失活（腺苷酰化作用）；EP——终产物；KG——α-酮戊二酸；GLN——谷氨酰胺[21,22]。

UR 酶始动谷氨酰胺合成酶的失活作用（腺苷酰化作用），它能催化P_I—D 向P_I—A 转化(脱尿苷酰化作用)。P_I—A 与 AT 酶相互作用，刺激了 AT 酶催化谷氨酰胺合成酶腺苷酰化作用的能力。同样，能催化P_I—A 向P_I—D 转化(尿苷酰化作用)的 UT 酶，也能始动谷氨酰胺合成酶的活化作用（脱腺苷酰化作用）。P_I—D与 AT 酶的相互作用，刺激了 AT 酶催化脱腺苷酰化作用的能力。所以被 P_I-蛋白始动的变构转变，反映了一个值得注意的情况，即在这种情况下，酶促反应的方向性和速率都受到影响。

腺苷酰化作用的稳定水平是由代谢物α-酮戊二酸、谷氨酰胺、UTP、ATP 和 P_i 所控制的。另外还有报道，RNA 部分可以改变 P_I 的活性[14]，而糖酵解途径的各种中间物可

抑制AT酶[17]，所以就提出，现已列出的生理调节剂的名单可能并不完全。α-酮戊二酸、谷氨酰胺和UTP对两个级联的对立效应，保证了腺苷酰化作用状态对这些效应物相对浓度的微小变化都非常敏感。也保证了可以严密地控制各种修饰酶的活性。这可减少反应（a）和（b）以及反应（c）和（d）的偶然偶联，因为如果它不被控制的话，则将导致因ATP和UTP水解而浪费能量。利用分离的蛋白质组分和某些效应物而作的重建实验已证明，通过腺苷酰化作用和尿苷酰化作用调节谷氨酰胺合成酶，消耗的ATP可少于1%，这部份ATP在谷氨酰胺的合成中直接为谷氨酰胺合成酶所利用（图5.1）。当然，可逆性共价修饰的酶调节所用的能量，比合成新的酶分子所需要的能量要少得多[23]。

虽然腺苷酰化作用状态是由α-酮戊二酸、谷氨酰胺、UTP、ATP和P_i调节的，而谷氨酰胺合成酶的活性却被8种不同的效应物（即谷氨酰胺代谢的终产物）调节（图5.1）。可以把谷氨酰胺与α-酮戊二酸的比率，看作是对NH_4^+浓度的敏感指数[24]，当NH_4^+过剩时，就消耗α-酮戊二酸，而形成谷氨酰胺（图5.1）。谷氨酰胺与α-酮戊二酸的比率增加了，就能使谷氨酰胺合成酶完全腺苷酰化。NH_4^+的重要作用不仅可以用这些情况下谷氨酰胺形成增加来解释，而且可以根据下列现象来说明，即NH_4^+在浓度高时，可以代替谷氨酰胺的酰胺基作为图5.1中所示的生物合成反应中的氮供体。相反地，在氮饥饿情况下，谷氨酰胺与α-酮戊二酸的比率就将降低，并可能发生完全的脱腺苷酰化作用。这就可以有效地清除掉任何可以被利用的NH_4^+。在大多数生长情况下，由全部效应物的相对水平所决定的腺苷酰化作用的中间状态总是占优势。这点看来似乎混杂分子的整个部分都能在体内形成，它表明对8种反馈抑制剂的敏感方

式是不同的。

UTP 的唯一作用就是刺激脱腺苷酰化作用及增加谷氨酰胺合成酶的活性，因而显然对抗了反馈抑制剂 CTP的 作用。或许这是一个需要平衡各种不同的核苷三磷酸合成（第二章）的另一个例子，或许它反映了细胞为了产生一个高度合成核酸能力的需要。

也可认为腺苷酰化作用是为达到需要谷氨酰胺才能使谷氨酰胺合成酶失活的一种间接的方式。与直接的变构效应相反，共价修饰的潜在优点，已在第四章中充分讨论过了。不过奇怪的是，只有革兰氏阴性细菌已进化到具有这种十分精巧的调节类型。在枯草杆菌中，谷氨酰胺本身就直接抑制谷氨酰胺合成酶，并且似乎不受共价修饰的控制[25]。不过大肠杆菌的酶调节作用仍然证明，原核生物也存在着控制机理，它的复杂性可与真核生物相比。由于未能进一步证实不同有机体所选择的控制机理是不同的，以致未发现在高等有机体中是通过腺苷酰化作用或尿苷酰化作用来控制，或在细菌中是通过磷酸化作用来控制（见5.2节[2]）。

5.1.4 未解决的问题

在阐明这个复杂系统方面，尽管已获得一些显著的成就，但仍然遗留下很多问题。例如，在体外当有 Mg^{++} 存在时，UR 酶要有 α-酮戊二酸或 ATP[21]才能被激活。因为这两种物质都是激活 UT 酶的效应物，所以绝不可能它们都是 UR 酶的生理激活剂。由于 Mn^{++}所引起的 UR 酶活性不需要ATP或α-酮戊二酸，所以在体内可能是 Mn^{++}而不是Mg^{++}激活了 UR酶。对于痕量金属离子，如Mn^{++}在代谢控制中的作用还了解得很少，不过或许三磷酸核苷、柠檬酸盐和其它强的螯合物，能够调节游离Mn^{++}浓度，并在依赖Mn^{++} 的酶的

调节中起作用。换言之，UR 酶的重要生理激活剂尚有待发现。

在催化谷氨酰胺合成酶的腺苷酰化作用和脱腺苷酰化作用方面，AT 酶复合体是不是同一个活性中心，或甚至同一个亚基，这个问题仍不清楚。企图将 UT 酶和 UR 酶分开的所有尝试都失败了，所以认为也可能是这两种蛋白质形成了一种酶复合物。

对于实际能够在体内形成的谷氨酰胺合成酶不同部份的腺苷酰化混杂物的数目、这些混杂物分子中腺苷酰基的相对位置的分析、以及有关这些过程动力学性质的研究，都还是刚刚开始。同样，有关具有不同特性的 P_I 蛋白质的部份尿苷酰化混杂物的可能性，还没有进行研究。对我们了解变构转换的性质将具有重要意义的某些更加细致深入的蛋白质化学的研究，亦尚待进行。

5.2 依赖 NAD⁺的ADP-核糖基化反应

5.2.1 白喉毒素的作用机理[26]

白喉症是由于人和其它某些哺乳动物的咽喉被白喉杆菌感染而引起的。尽管这种细菌本身局限于上呼吸道，但由于感染，很多内部器官受到损害。其原因是因为白喉杆菌分泌一种特殊的蛋白质，它循环于全身，并且是引起疾病的致病性物质。这种毒素对实验用的豚鼠只需要0.1μg/kg体重的剂量，于 4—5 天内即可致死。

由于发现这种毒素被加到培养基的生长细胞时，能在 1—2 小时内完全阻抑蛋白质的合成[27]，这才对这种剧毒的特性开始有所了解。不过在无细胞的蛋白质合成系统中，发现抑制作用取决于辅因子 NAD⁺和这种毒素。

蛋白质合成组织中受到影响的唯一组分似乎是延伸因子2（T_{I}）。尽管对依赖 GTP 的肽基tRNA 从核蛋白体的受体部位移位到供体部位时，T_{I} 是必需的，而且在肽键形成每一轮后 mRNA 移动一个核苷酸三联体时也是必需的，但是 T_{I} 的确切作用还不清楚。已经证明 T_{I} 的失活是与白喉毒素催化依赖 NAD^{+}的T_{I} 共价修饰有关（图5.6）。这种毒素就是催化T_{I} 的 ADP-核糖基化的酶，这一发现为白喉毒素的剧毒特性提供了简单的解释。ADP-核糖基连接到一个弱碱性的氨基酸（*X*）上，这个氨基酸与一般在蛋白质中发现的一些氨基酸不一样（图5.6[28]）。通过这种毒素识别这个异常的氨基酸残基，就可解释为什么还没有找到其它可以作为

$$T_{I}+N^{+}RPPRA \longrightarrow T_{I}-RPPRA+N+H^{+}$$

thr－leu－his－ala－asp－ala－ile－x（R-PPRA）－arg

图5.6　白喉毒素催化 T_{I} 失活的机理及 ADP-核糖基化部位上的氨基酸序例。N——烟酰胺；R——核糖；P——磷酸[18b,28]。

毒素底物的蛋白质。T_{I} 的ADP-核糖基化看来破坏了与RNA部份的结合能力。T_{I}－RPPRA 仍然可以结合GTP，并且 T_{I}－RPPRA－GTP 也仍可以结合核蛋白体。

白喉毒素合成后，并没有酶促活性，它必须首先经过蛋白酶切断，再用硫醇还原它的二硫键，才表现出活性。图5.7示出了胰蛋白酶对白喉毒素的激活机理。胰蛋白酶在三个紧挨着的精氨酸残基（氨基末端的189、191和192）处“切下”分子。然后经过还原作用产生一个具有酶促活性的N末端的A片段和一个没有活性的C末端的B片段，不过当把它们加到培养细胞中，那么与完整的或是有切口的毒素相反，无论A片段或是B片段都没有毒性。

人们已经分离出了许多突变种毒素，它们没有毒性，它

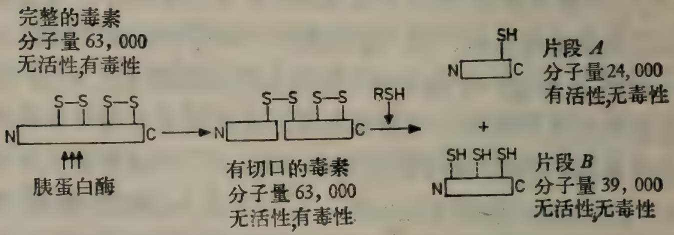


图5.7 胰蛋白酶激活白喉毒素的机理[26]。

们或是缺少分子的A部分，或是缺少分子的B部分。在有胰蛋白酶与硫醇存在的情况下，如果把一个缺少A部分的没有毒性的突变种蛋白质，加到缺少B部分的没有毒性的突变种蛋白质中，然后通过透析除去硫醇，并使二硫键重新氧化，这样就产生了毒性。这些“杂交”实验很清楚地证明，对于毒性来讲B部分是不可缺少的，而且毒性也有赖于 ADP-核糖基化作用的存在。人们发现那种含有无活性的A片段的无毒突变种毒素，在细胞培养中是天然毒素作用的竞争性抑制剂，所以认为毒素是与细胞表面上的一个特殊受体部位相结合的。

于是人们就提出关于毒素作用的假设：完整的或“有切口”的毒素与靶细胞外膜上一个或几个特殊部位相互作用，这种特殊部位可能与B片段的某些部分有关。然后毒素按照一种至今人们尚不清楚的机理穿过细胞膜。毒素在体内能通过血液中（第三章）或细胞内的蛋白酶而被切开。假设二硫键的还原是利用谷胱甘肽在细胞内发生的，那么细胞中硫醇的浓度(2mM）是足够完成这个反应的。它释放出A片段，然后催化 T_I 失活。在体内各种器官中停止蛋白质合成，于是致使器官受到损害。所以看来这个过程包括限制性蛋白水

解与ADP-核糖基化作用这两种类型的共价修饰。

近来研究表明，从一种毫无关系的细菌 *P.aeruginosa* 分离出的毒素，能正确地催化和白喉毒素相同的反应[29]。由于这种毒素可以引起很不相同的临床症状，例如它引起狗和猴子低血压性休克，所以它的细胞专一性必定与白喉毒素不同。一种毒素在体内的稳定性，对于决定它的毒性来讲也必然是一个很重要的因素。

另一种唯一对其作用机理完全了解的细菌毒素，就是能引起霍乱的蛋白质。这种蛋白质似乎是腺苷酸环化酶的专一性激活剂（第四章）。cAMP 的显著提高，可破坏肠细胞保持水份的能力，导致由于脱水而死亡。最近关于需要 NAD^+ 的证据[30]，使人们认为 ADP-核糖基化作用也可能是这种毒素作用的基础。

白喉杆菌只有当它们被某些噬菌体感染后才产生毒素；并且现已清楚白喉毒素的结构基因是起源于噬菌体基因组。虽然下面一节将表明 ADP-核糖基化是噬菌体用以使它们寄生的细菌功能失活的一个共同机理，但这个引人注目的发现的含意，则在别处加以讨论[26]。

5.2.2 噬菌体T4感染引起大肠杆菌RNA聚合酶的失活

噬菌体 T4 侵入大肠杆菌细胞后，几分钟内细菌细胞就从转录宿主的基因组改变为转录噬菌体 T4 的基因，但是大肠杆菌的 RNA 聚合酶也照例转录噬菌体基因。这些变化似乎是这通过这两种不同的称作转变作用和修饰作用的 ADP-核糖基化作用来完成的[31]。

转变作用是由存在于 T4“头”部的 ADP-核糖基转移酶催化的（它与 T4DNA 一起注入细菌）。这就导致聚合酶（$\beta\beta'\alpha_2\sigma$ 结构）上的专一性精氨酸残基 ADP-核糖基化。α

和σ亚基以及较少程度的β和β′亚基发生转变了。人们认为，这种键合的稳定性是由于在ADP-核糖基和精氨酸胍基之间形成了N-糖苷键。转变作用是在感染后一分钟内发生的，但α亚基的转变不超过50%。然而感染几分钟后，β、β′和σ亚基的转变就逆转了。由于噬菌体在缺乏ADP-核糖基转移酶的突变种中仍然可以增殖，所以转变作用的确切作用是什么，尚不清楚[31]。

修饰作用是在转变作用后的几分钟内发生的，并依赖于感染细胞内的蛋白质合成。它可使α-亚基上的专一性精氨酸残基产生定量的修饰[22b]。修饰作用可使α亚基上的专一性精氨酸残基完全ADP-核糖基化[22b]。这就阻碍了聚合酶转录大肠杆菌基因组，而不阻碍转录T4基因，从而证明，对于聚合酶与大肠杆菌基因组上的启动子部位相互作用来讲，α-亚基是必须的[32]。初步证据认为，在转变作用和修饰作用过程中，α-亚基上的同一个残基被ADP-核糖基化了。不过，这两种反应是被不同的酶所催化的，因为alt⁻和mod⁻的突变是发生在噬菌体基因组的不同部位[33]。

和噬菌体T4相反，噬菌体T7可为蛋白质激酶编码，此蛋白质激酶是催化苏氨酸残基（这些残基存在于很多大肠杆菌蛋白质上，包括RNA聚合酶的β′亚基）广泛的磷酸化作用[34]。这可能是阻止同时发生宿主合成RNA的基础(因为在激酶突变体中并不阻止RNA合成)。与噬菌体T4不同，T7可以为本身的RNA聚合酶编码，接着转录噬菌体基因。T7诱导的体内磷酸化作用的不可逆性，反映出细菌中缺乏蛋白质激酶和蛋白质磷酸酶（5.1节）。

5.2.3 真核细胞的ADP-核糖基化作用

肝脏腺粒体具有一个可以催化依赖于NAD^+的将ADP-

核糖转移到专一性受体蛋白质上的系统[35]。与白喉毒素或噬菌体催化ADP-核糖基化作用不同，这个反应需要 Mg^{++}。这种修饰作用在细胞生长与 $NAD^+/NADH$ 水平相互联系中的可能作用，是一个有待进一步研究的问题。

人们已从肝脏细胞核中分离出经一个（或多个）磷酸丝氨酸残基与组蛋白 H_1 共价连接的多聚-ADP-核糖[36]。这种作用以及其它一些染色体蛋白质的共价修饰（磷酸化，乙酰化和甲基化）的作用都还不清楚。还没有发现酶通过可逆的乙酰化或甲基化进行调节的实例。很多在细胞内的蛋白质包括酶，是在它们的 N-端被乙酰化的。不过这些几乎都是不可逆的转录后修饰，其可能的作用在于保护蛋白质免受氨基肽酶的降解。

参 考 文 献

〔1〕Woolfolk, C. A. and Stadtman, E. R. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17, 313-319;(1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 736-755.

〔2〕Stadtman, E.R., Shapiro, B.M., Kingdon, H.S., Woolfolk, C.A. and Hubbard, J.S.(1968), *Adv.Enz*.Reg., 6, 257-289.

〔3〕Shapiro, B.M. and Stadtman, E.R.(1970), *Ann. Rev. Microbiol.*, 24, 501-524.

〔4〕Valentine, R. C., Shapiro, B. M. and Stadtman, E. R. (1968), *Biochemistry*, 7, 2143-2152.

〔5〕Holtzer, H., Mecke, D., Wulff, K. Liess, K. and Heilmeyer, L. (1967), *Adv.Enz. Reg.*, 5, 211-225.

〔6〕Kingdon, H.S. and Stadtman, E.R.(1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27 470-473.

〔7〕Shapiro, B. M., Kingdon, H.S. and Stadtman, E. R. (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58, 642-649.

〔8〕Kingdon, H.S., Shapiro, B.M. and Stadtman, E.R. (1967), 58, 1703-1710.

〔9〕Wulff, K., Mecke, D. and Holtzer, H. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 740-745.

〔10〕 Stadtman, E. R., Ginsburg, A., Ciardi, J.E., Heh, J., Hennig, S.B. and Shapiro, B.M. (1970), *Adv. Enz.Reg*., 8, 99–118.
〔11〕 Ciardi, J. E., Cimino, F. and Stadtman, E. R.(1973), *Biochemistry*, 12, 4321–4330.
〔12〕 Hurd, S.S., Teller, D.C. and Fischer, E.H. (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 24 79–84.
〔13〕 Anderson, W. B. and Stadtman, E. R. (1970), *Biochem. Biophys. Res.Commun*., 41, 704–709.
〔14〕 Shapiro, B.M.(1969), *Biochemistry*, 8, 659–670.
〔15〕 Anderson, W.B., Hennig, S.B., Ginsburg, A. and Stadtman, E.R.(1970), *Proc. Nat. Acad. Sci*., 67 1417–1424.
〔16〕 Hennig, S. B., Anderson, W.B. and Ginsburg, A. (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci*., 67, 1761–1768
〔17〕 Ebner, E., Wolf, D., Gancedo, C., Elsasser, S., and Holtzer, H.(1970), *European J. Biochem*., 14, 535–544.
〔18〕 *Metabolic Interconversions of Enzymes* 1971, (1972), (Eds) Helmreich, E., Holtzer, H. and Wieland, O., Springer-Verlag, Heidelberg.(a) Stadtman, E. R., Brown, M., Segal, A., Anderson, W. A., Hennig, S. B., Ginsberg, A. and Mangum, J. H. 231–244; (b) Honjo, T., Ueda, K., Tanabe, T. and Hayaishi, O. 193–207.
〔19〕 Brown, M. S., Segal, A. and Stadtman, E. R. (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci*., 68, 2949–2953.
〔20〕 Mangum, J.H., Magni, G. and Stadtman, E.R. (1973), *Arch. Biochem. Biophys*., 158, 514–525.
〔21〕 Adler, S. P., Purich, D. and Stadtman, E.R.(1975), *J. Biol. Chem*., 250, 6264–6272.
〔22〕 *Metabolic Interconversions of Enzymes* 1973, (1974), (Eds) Fischer, E.H., Krebs, E.G., Neurath, H. and Stadtman, E. R., Springer-Verlag, Heidelberg. (a) Adler, S. P., Mangum, J.H., Magni, G. and Stadtman, E.R. 221–233; (b) Goff, C.G. 235–244.
〔23〕 Segal, A., Brown, M.S. and Stadtman, E. R. (1974), *Arch. Biochem. Biophys*., 161, 319–327.
〔24〕 Schutt, H. and Holtzer, H. (1972), *Eur.J.Biochem*., 26, 68–72.
〔25〕 Hubbard, J.S. and Stadtman, E. R. (1967), *J.Bacteriol*., 94, 1007–1015.
〔26〕 Collier, R.J. (1975), *Bacteriol.Rev*., 39, 54–85.
〔27〕 Strauss, N. and Hendee, E.D. (1959), *J.Exp.Med*., 109, 145–163.
〔28〕 Robinson, E. A., Henriksen, O. and Maxwell, E. S. (1974),

J. Biol. Chem., 249, 5088-5093.
〔29〕 Iglewski, B.H. and Kabat, D. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2284-2288.
〔30〕 Gill, D.M. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2064-2068.
〔31〕 Rohrer, H., Zillig, W. and Mailhammer, R. (1975), *Eur. J. Biochem.*, 60, 227-238.
〔32〕 Mailhammer, R., Reiness, G., Ponta, H., Yang, H.L., Schweiger, M., Zillig, W. and Zubay, G. (1976), In *Metabolic Interconversions of Enzymes 1975*, (Ed) Shaltiel, S., Springer-Verlag Heidelberg, *in press*.
〔33〕 Horvitz, H. R. (1974), *J. Mol. Biol.*, 90, 727-750.
〔34〕 Zillig, W., Fujiki, H., Blum, W., Janekovic, D., Schweiger, M., Rahmsdorf, H., Ponta, H. and Hirsch-Kauffman, M. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2506-2510.
〔35〕 Kun, E., Zimber, P. H., Chang, A.C.Y., Puschendorf, B. and Grunicke, H. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 1436-1440.
〔36〕 Smith, J. A. and Stocken, L.A. (1975), *Biochem. J.*, 147, 523-529.

第六章　变构转变的性质

在撰写本书时，对于第二、四、五章所描述的经典的变构酶结构，了解的还很少。已经发表的仅仅是有关ATC酶调节亚基的完整的一级结构，而且其中有好几种酶还没有得到结晶。虽然ATC酶和磷酸化酶的三级结构已解决到6Å[1,2]，但是，在这种分辨率上，只能确定酶的整个形状，而对酶结构的细节还不能了解。用高分辨率解决这两种酶的结构，可能还需要一些时间，同时还需要更长的时间，才能弄清伴随变构效应物结合而引起的酶构象变化的细节。由于这个缘故，关于变构转变性质的近代概念，很大程度依靠从一个酶（胰凝乳蛋白酶）、一个非酶蛋白质（血红蛋白）和一些理论的概念而得到的一些有关结构的知识。

象第三章讨论过的，关于胰凝乳蛋白酶原向胰凝乳蛋白酶转变，可以代表在变构转变时发生的那种变化。然而，按照原来的定义（第二章）严格来讲，这种转变并非变构转变，因为它的转变既不是被结合变构效应物过程所触发，并且这种转变还是不可逆的；而且胰凝乳蛋白酶也不显出一个S形饱和曲线（这种曲线在一些变构酶，当以酶活性对底物浓度作图时可以观察到）。

我们的很多关于S形效应来源的看法，是从对血红蛋白的研究推导而来的。血红蛋白具有$\alpha_2\beta_2$结构，两类亚基每个分子量接近16,000道尔顿，每个都含有一个血红素基团。每个血红素的铁原子结合一个氧分子，因此，当血红蛋白进行充分氧合作用时，总共可结合4个氧分子。携氧和脱氧血红

蛋白具有相似的但又不同的三级结构。在对二个结构作一比较后可以认为，当与氧结合时，铁原子移到血红素环的平面。由于铁原子牢固地连接于α和β亚基特殊的组氨酸残基上，所以这就触发了每个亚基结构上一系列的各自并不连续的变化，以及触发了亚基彼此相互位置的重新排列[3,4]。

60多年前就知道，当以血红蛋白的氧合作用对氧分压作图时，得到一条大弯度的S形曲线。对这条曲线的形状进行了分析以后提出，如果第一个氧分子与四个血红素基团中的任何一个结合相对困难的话，就会出现S形的特征，而一旦第一个氧分子结合成功，那么氧分子的进一步结合就比较容易进行了。由于血红素基团距离太远不能直接相互影响，并且氧合血红蛋白和脱氧合血红蛋白的构型不同，于是提出对第一个氧分子与血红蛋白结合的约束，可能与脱氧血红蛋白的特殊构型有关。

这种观念后来发展成为两种能够从理论上说明蛋白质和酶的S形效应的数学模式。有关每种数学模式的详细情况，读者可参考原著[5,6]及两篇优秀的评论[7,8]。

在Koshland的模式中[5]，氧分子与第一个亚基相结合，引起亚基发生结构改变。这种改变通过将两个多肽链连接在一起的亚基接触而转移到邻近的亚基上。第二个亚基所引起的结构改变使得它更易于与氧结合。然后又影响第三个亚基的构象，依比类推。

在Monod的模式中[6]，假定血红蛋白是以两种构象状态的平衡混合物而预先存在；一种是以低亲合力与氧结合的“紧张”态或称T态，另一种是以高亲合力与氧结合的“松弛”态或称R态。无氧时，血红蛋白主要是T态，而当加入氧后，氧优先与R态的血红蛋白结合，于是平衡朝向R态方向改变，并且使与氧结合的部位有更高的亲合力。氧的多结合

部位结合，以及T态及R态之间的平衡改变，引起了S形效应。

血红蛋白结构的X-射线结晶学分析，未能区分两种假说。结晶作用就是使分子冻结成为一个特殊构型的过程，已经证明部份氧合分子的构象分析是不可能的[4]。

Monod 模式和 Koshland 模式的区别在于：在 Monod 模式中，假定蛋白质在无氧时存在两种构象，并且根据所有亚基的构象同时改变的"协调一致"的机理，发生由T态向R态的转变；而在Koshland模式中，构象变化是通过许多不同的步骤而"序贯地"发生的。但是这两种模式都要求蛋白质具有下列结构上的特征，即蛋白质至少具有两种构象，必须具备可与氧结合的多种部位(因此要具有多种亚基)，并且加入氧后一定能促使其向具有高亲合力结合氧的形式转变。

通过对这两种理论所作的这种简单的定性说明，显然可以认为，发生S形反应的机理与变构转变非常相似。通过类似CTP 抑制 ATC 酶(第二章)或 cAMP激活 cAMP-PrK （第四章）的机理，氧在一个部位上的结合，可能影响氧在远离部位上的结合。而且血红蛋白的氧合作用曲线完全类似于以酶活性对底物浓度作图得到的 S 形曲线（图2.4,2.11,2.15）。用这两种模式可以简单地解释很多变构效应物的作用机理。按照 Monod 的说法，变构抑制物常常通过使平衡移向T态而起作用，将S形饱和曲线向右移而使曲线更具S形（如 CTP 对ATC 酶的影响，图2.11）。相反地，变构激活剂会促使R态形成，使S形饱和曲线向左移动，使曲线更呈双曲线形（如缬氨酸对苏氨酸脱氨酶的作用，图2.4或ATP对 ATC 酶的作用，图2.11）。

虽然这两种理论都要求酶由两种或多种亚基组成，但有必要强调指出，尽管大多数细胞内的酶具有这种结构，但只

有极少数的酶显示出S形动力学性质，或是可被变构效应物所调节。通过探讨哺乳动物中转变肌肉的糖原和葡萄糖为乳酸的酶，就能恰当地说明这一点（图6.1）。从图6.1中可以看到14种酶中有10种是由两个或多个亚基组成，可是只有两种呈现S形动力学特征，或可被变构效应物调节。而且4种没有亚基结构的单体酶之一（己糖激酶），是被变构效应物（G6P）所调节。G6P对葡萄糖来说是非竞争性抑制物，而对第二个底物ATP来说，它是竞争性抑制物[9]。没有S形

酶	亚基分子量×10^{-3}	亚基的数目	变构调节作用
己糖激酶	96	1	有（$G6P^-$）
磷酸化酶	100	2	有(AMP^+,ATP^-,$G6P^-$)
脱支酶	160	1	无
葡糖磷酸变位酶	62	1	无
己糖磷酸异构酶	65	2	无
磷酸果糖激酶*	85	4	有(P_i^+, AMP^+, FDP^+, NH_3^+, ATP^-, 柠檬酸$^-$)
醛缩酶	40	4	无
丙糖磷酸异构酶	26	2	无
G3P 脱氢酶	36	4	无
磷酸甘油酸激酶	45	1	无
磷酸甘油酸变位酶	26	2	无
烯醇酶	41	4	无
丙酮酸激酶	57	4	无
乳酸脱氢酶	35	4	无

* 见文献〔8〕。(+)——激活；(-)——抑制。

图6.1　哺乳动物肌肉糖酵解酶的性质。

效应,并且变构转变必定是在单个亚基内介导的,就像胰凝乳蛋白酶原-胰凝乳蛋白酶的转变一样。显然,S形特性并不是

变构效应物控制酶活性的先决条件。

除了 Koshland 和 Monod 的模式外，也可能用不要求酶具有多种与底物结合部位的各种动力学模式来解释 S 形现象[8]。于是，可从这些模式看出，单体酶也可能显示其酶活性对底物浓度的 S 形依赖关系。鉴于各种不同的酶利用的控制机理表现明显多样性，所以看来完全有可能调节酶已同样演发出一套多种多样的产生 S 形曲线效应的机理，并且，在更详细地分析了各种酶的结构后，就可以发现能解释所有可能的理论的实例。

在第二章中已指出，S 形反应反映了酶活性对底物或效应物在一特定的浓度范围的波动更为敏感。然而事实上在体内唯一能证明 S 形效应的蛋白质就是血红蛋白，因为在完整的红细胞中，可以很容易发生伴随着氧合作用的特有光谱改变。

结 束 语

本书重点阐述了通过对纯化酶的详细分析而显示出来的酶控制机理的多样性，以及与确定这些控制机理在生理学上的重要性有关的实验性问题。例如，试图和决定在肌肉细胞内实际上是否发生 AMP 对磷酸化酶的激活，比研究哪一个理论模式能最好地阐明酶活性对 AMP 浓度的 S 形依赖关系，似乎更加具有生物学上的意义。然而很多大学的标准“生物化学”教科书，强调了这些理论模式，实际上排挤了其它方面的酶调节作用。希望本书能有助于弥补一点这方面的不足。

参 考 文 献

〔1〕Warren, G.G.,Edwards, B. F.P.,Evans, D.R, Wiley, D.C. and Lipscomb, W. N. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 1117–1121.

〔2〕Johnson, L. N.,Madsen,N.B., Mosley, J. and Wilson, K.S. (1974),*J. Mol.,Biol.*,90, 703–717.

〔3〕Perutz, M. F. (1970),*Nature*, 228, 726–734; 237, 495–499.

〔4〕Benesch, R. Benesch, R. E. and Bauer,C.(1975)In *The Red Blood Cell*, (Ed) Surgenor,D., Academic Press, London and New York, pp. 825–839.

〔5〕Koshland,D.E., Nemethy, G.and Filmer,D.(1966),*Biochemistry*, 5, 365–385.

〔6〕Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.P. (1965),*J.Mol. Biol.*, 12, 88–118.

〔7〕Koshland, D.. W. (1969), *Curr. Top. Cell. Reg.*, 1,1–27.

〔8〕Newsholme, E. A. and Start, C. (1973), *Regulation in .Metabolism*, Chapter 2, John Wiley and Sons, London.

〔9〕Colowick, S.P. (1973),In *The Enzymes* (3rd Edtn.)IX, 1–14. (Ed) Boyer, P.D., Academic Press, London.

中科院植物所图书馆
S0013823

收到期 83年5月4日
来源 .7.64(14册)
书价
单据号
开票日期

58.35
410
012466
酶活性的控制

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期

012466

统一书号：13031·
定　价：0.58
本社书号：2786·13-10
科技新书目：35-38